

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of:

Takai *et al.*

Appl. No. (To be assigned)

Filed: (Herewith)

For: **ADIP Protein and Use Thereof**

Confirmation No. (To be assigned)

Art Unit: (To be assigned)

Examiner: (To be assigned)

Atty. Docket: 2144.0100000/RWE/ALS

**Claim For Priority Under 35 U.S.C. § 119(a)-(d) In Utility
Application**

Commissioner for Patents
PO Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Mail Stop Patent Application

Sir:

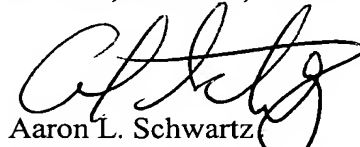
Priority under 35 U.S.C. § 119(a)-(d) is hereby claimed to the following priority document, filed in a foreign country within twelve (12) months prior to the filing of the above-referenced United States utility patent application:

Country	Priority Document Appl. No.	Filing Date
Japan	2002-284263	September 27, 2002

A certified copy of each listed priority document is submitted herewith. Prompt acknowledgment of this claim and submission is respectfully requested.

Respectfully submitted,

STERNE, KESSLER, GOLDSTEIN & FOX P.L.L.C.



Aaron L. Schwartz
Agent for Applicants
Registration No. 48,181

Date: August 20, 2003

1100 New York Avenue, N.W.
Washington, D.C. 20005-3934
(202) 371-2600

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2002年 9月27日
Date of Application:

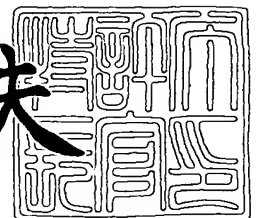
出願番号 特願2002-284263
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP 2002-284263]

出願人 エーザイ株式会社
Applicant(s):

2003年 8月12日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2003-3065058

【書類名】 特許願

【整理番号】 E1-X0202

【特記事項】 特許法第 3 0 条第 1 項の規定の適用を受けようとする特
許出願

【提出日】 平成14年 9月27日

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

 【住所又は居所】 兵庫県神戸市西区学園東町 2 - 5 - 7 3

 【氏名】 高井 義美

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府吹田市津雲台 5 - 1 4 D 3 7 - 1 0 4

 【氏名】 入江 賢児

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府大阪市淀川区宮原 3 - 3 - 1 1 - 1 1 1 1

 【氏名】 浅田 成紀

【特許出願人】

 【識別番号】 000000217

 【氏名又は名称】 エーザイ株式会社

 【代表者】 内藤 晴夫

【代理人】

 【識別番号】 100102978

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

 【識別番号】 100108774

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ADIPタンパク質、およびその利用

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記(a)から(d)のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

(a)配列番号：2 または 4 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

(b)配列番号：1 または 3 に塩基配列のコード領域を含むポリヌクレオチド。

(c)配列番号：2 または 4 に記載のアミノ酸配列において、1 もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなり、アフアディンまたはアクチニンとの結合活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

(d)配列番号：1 または 3 に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、アフアディンまたはアクチニンとの結合活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 2】 請求項 1 に記載のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド。

【請求項 3】 請求項 1 に記載のポリヌクレオチドが挿入されたベクター。

【請求項 4】 請求項 1 に記載のポリヌクレオチドまたは請求項 3 に記載のベクターを保持する宿主細胞。

【請求項 5】 請求項 4 に記載の宿主細胞を培養し、該宿主細胞またはその培養上清から、産生させたポリペプチドを回収する工程を含む、請求項 2 に記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項 6】 請求項 1 に記載のポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を持つポリヌクレオチド。

【請求項 7】 請求項 1 に記載のポリヌクレオチドもしくはその一部に対するアンチセンスポリヌクレオチド。

【請求項 8】 請求項 2 に記載のポリペプチドに結合する抗体。

【請求項 9】 以下の(a)～(c)の工程を含む、アクチン骨格を制御する薬剤

のための候補化合物のスクリーニング方法。

(a) アファディンまたはアクチニンと、請求項 2 に記載のポリペプチドおよび被検化合物を接触させる工程、

(b) アファディンまたはアクチニンと、請求項 2 に記載のポリペプチドとの結合活性を測定する工程、

(c) 被検化合物を接触させない場合と比較して、上記結合活性を変化させる化合物を選択する工程

【請求項 10】 被検者における請求項 2 に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を検出することを特徴とする、心臓疾患の検査方法。

【請求項 11】 以下の (a) ~ (c) の工程を含む、請求項 10 に記載の検査方法。

(a) 被検者の心筋細胞から RNA 試料を調製する工程

(b) 該 RNA 試料に含まれる請求項 2 に記載のポリペプチドをコードする RNA の量を測定する工程

(c) 測定された RNA の量を対照と比較する工程

【請求項 12】 以下の (a) ~ (c) の工程を含む、請求項 10 に記載の検査方法。

(a) 被検者の心筋細胞からタンパク質試料を調製する工程

(b) 該タンパク質試料に含まれる請求項 2 に記載のポリペプチドの量を測定する工程

(c) 測定されたポリペプチドの量を対照と比較する工程

【請求項 13】 心臓疾患が心筋梗塞または心筋炎である、請求項 10 ~ 12 のいずれかに記載の疾患。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規なアファディン DIL ドメイン結合性タンパク質 (ADIP) および該タンパク質をコードする遺伝子ならびに該遺伝子を利用した疾患の治療薬のスクリーニング方法、並びに、該疾患の診断方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

多細胞生物中の細胞は、その隣接細胞を認識し、それらに接着し、細胞間結合を形成する。そのような結合は、形態形成、分化、増殖および移動などの各種の細胞機能において欠かせない役割を備えている（非特許文献1～6参照）。分極上皮細胞において、細胞間接合は密着結合（tight junctions; TJs）、接着結合（adherens junctions; AJs）およびデスモソームよりなる接合部複合体によって仲介される。これらの結合構造は通常、先端から基底側に整列しているが、デスモソームは他の領域に独立して分布している。

【0003】

AJsは当初、アクチンフィラメント（F-アクチン）束が裏打ちされている濃い細胞質プラークによって補強され、近くに並んだ形質膜ドメインとして、超微細構造解析を用いて定義された（非特許文献7参照）。分子解析によると、AJsは、典型的なカドヘリンが細胞接着分子と同様に機能し、アクチンをベースとした細胞骨格および数種の細胞質成分が集合する細胞-細胞接着部位であることを示している（非特許文献8および9参照）。E-カドヘリンは他の典型的なカドヘリンと同様に、細胞外ドメインが Ca^{2+} に依存する方法で同種親和性認識および接着性結合を仲介する、シングルパス膜貫通タンパク質である（非特許文献10参照）。E-カドヘリンは、 α -、 β -および γ -カテニン、 α -アクチニンおよびビンキュリン（vinculin）を含む周囲の膜タンパク質を通じて、アクチン細胞骨格に会合する（非特許文献11～14参照）。 β -カテニンは、E-カドヘリンの細胞質尾部と直接相互作用して、E-カドヘリンを、F-アクチンに直接結合している α -カテニンに結合させる（非特許文献15参照）。 α -アクチニンおよびビンキュリンは、 α -カテニンに直接結合しているF-アクチン-結合タンパク質である（非特許文献13、14、および16参照）。

【0004】

E-カドヘリンとアクチン細胞骨格との、これらの末梢膜タンパク質を通じた会合により、E-カドヘリンの細胞-細胞接着が強化される（非特許文献1および17参照）。

【0005】

本発明者らは、別の細胞-細胞接着分子であるネクチン、およびネクチンに会合したF-アクチン結合タンパク質であるアフアディンも、AJsに局在していることを見出した（非特許文献18および19参照）。ネクチンおよびアフアディンは、AJsに厳密に局在し、これは、F-アクチン束が裏打ちされている濃い細胞質プラークにより補強された近くに並べられた形質膜ドメインとして、超構造的解析を使用して規定された（非特許文献7、18、および19参照）。これに対し、E-カドヘリンは、AJsに集中しているが、側方形質膜の先端から基底側までより広範に分布している（非特許文献2および20参照）。ネクチンは、 Ca^{2+} 独立的免疫グロブリン様細胞-細胞接着分子である（非特許文献19、21～25参照）。ネクチンは、現在のところ、4つの膜、すなわちネクチン-1、-2、-3、および-4からなる族を含む。ネクチン-4を除く全ネクチンが、2または3つのスプライス変異体を有し、ネクチン-1 α 、-1 β 、-2 α 、-2 δ 、-3 α 、-3 β 、および-3 γ アイソフォームが存在している（非特許文献19、24～30参照）。ネクチン-1は、最初、ポリオウイルス受容体関連タンパク質（PRR1）の1つとして同定された（非特許文献29参照）。ネクチン-2は最初、ヒトポリオウイルス受容体タンパク質のネズミホモログとして同定されたが（非特許文献26参照）、後に別のポリオウイルス受容体関連タンパク質（PRR2）であることが判明した（非特許文献28および29参照）。それらは後に、 α -ヘルペスウイルスの受容体として作用し、該ウイルスの侵入および細胞内への広がりを容易にすることが示され、それぞれHveCおよび-Bと再度命名された（非特許文献30～35参照）。すべてのメンバーは、3つの免疫グロブリン様ループ、1回膜貫通領域、および細胞質領域を有する細胞外ドメインを有する。さらに、ネクチン-1 β 、-3 γ 、および-4を除く、すべてのメンバーは、4つのアミノ酸残基（Glu/Ala-X-Tyr-Val）の保存モチーフをそのカルボキシル末端に有する。このモチーフは、アフアディンのPDZドメインに結合する（非特許文献18、19、24、および25参照）。

【0006】

アフアディンは、少なくとも2つのスプライス変異体、すなわちl-アフアディンおよびs-アフアディンを有する（非特許文献18参照）。大きい方のスプライ

ス変異体であるl-アファディンは、ネクチンへ結合し、またF-アクチン結合ドメインを介してF-アクチンに結合する。l-アファディンは、F-アクチンの側面に結合するが、それに架橋して束を形成しない。アファディンは、2つのRas会合ドメイン (RA) 、フォークヘッド会合ドメイン (FHA) 、希釈ドメイン (DIL) 、PDZドメイン、2つのプロリンリッチドメイン (PR) 、および1つのF-アクチン結合PRドメインを有する (図 1 A 参照) 。DILドメインは、アファディン、および、dilute (DIL) 、Myo2およびMyo4を含むV型ミオシンに見出される。しかしその機能は依然として不明である (非特許文献 3 6 参照) 。DILドメインを含むMyo4領域が、アダプタータンパク質であるShe3に結合するという近年の知見 (非特許文献 3 7 および 3 8 参照) から、DILドメインがタンパク質-タンパク質相互作用に関与することが示される。

【 0 0 0 7 】

小さい方のスプライス変異体であるs-アファディンは、2つのRA、FHA、DIL、PDZ、および2つのPRドメインを有するが、F-アクチン結合PRドメインを欠失している。ヒトs-アファディンは、急性骨髄性白血病に関与するALL-1融合対として同定された遺伝子である、AF-6の遺伝子産物と同一である (非特許文献 3 9 参照) 。特記しない限り、本明細書中で、アファディンはl-アファディンを意味する。

【 0 0 0 8 】

ネクチンは、線維芽細胞および上皮細胞において、アファディンおよび α -カテニンを介して、ネクチンをベースとした細胞-細胞接着部位にE-カドヘリン- β -カテニン複合体を補充する効力を有する (非特許文献 4 0 および 4 1 参照) 。ネクチンはさらに、線維芽細胞および上皮細胞においてアファディンを介して、ネクチンをベースとした細胞-細胞接着部位にZO-1、クローディン、オクルーディン、および接合部接着分子 (JAM) を含むTJの成分を補充する効力を有する (非特許文献 4 1 ~ 4 3 参照) 。クローディンは、TJ鎖を形成する重要な細胞-細胞接着分子であり (非特許文献 4 4 ~ 4 7 参照) 、オクルーディンおよびJAMは、TJsにおける他の膜貫通タンパク質である (非特許文献 4 6 ~ 4 8 参照) 。クローディン、オクルーディン、およびJAMは、F-アクチン結合足場分子であるZO-

1と相互作用する（非特許文献49～60参照）。アフアディン（-/-）マウスおよび（-/-）胚様体の上皮細胞では、AJsおよびTJsの適切な組織化が損なわれている（非特許文献61参照）。ネクチン-1は、近年、唇裂／口蓋、合指、精神遅滞、および外胚葉異形成を特徴とする、唇裂／口蓋-外胚葉異形成に関与することがポジショナルクローニングにより決定した（非特許文献62参照）。

【0009】

さらに、本発明者らは、近年、ネクチン-アフアディン系は、ニューロン中でN-カドヘリンと協働してシナプス形成に関与し（非特許文献63参照）、ネクチン-アフアディン系は、精巣中のセルトリ細胞-精細胞接合部の組織化における重要な接着系を構成する（非特許文献64参照）ことを見出した。したがって、ネクチンおよびアフアディンは、既知の細胞接着分子と共に、またはそれとは独立的に、多種多様の細胞間接合部の組織化に重要である。しかし、ネクチン-アフアディン系がこれらの細胞間接合部を組織化する分子機序に関しては、依然として完全に解明されていない。

【0010】

【非特許文献1】

Takeichi, M. 著、「Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator.」、Science、1991年、Vol.251、p.1451-1455.

【非特許文献2】

Gumbiner, B.M. 著、「Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis.」、Cell、1996年、Vol.84、p.345-357

【非特許文献3】

Vleminckx, K. および R. Kemler 著、「Cadherins and tissue formation: integrating adhesion and signaling. Bioessays.」、1999年、Vol.21、p.211-220

【非特許文献4】

Tepass, U. (外4名) 著、「Cadherins in embryonic and neural morphogenesis.」 Nat. Rev. Mol. Cell Biol.、2000年、Vol.1、p.91-100

【非特許文献5】

Takeichi, M. (外4名) 著、「Patterning of cell assemblies regulated by a

hesion receptors of the cadherin superfamily.」、Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.、2000年、Vol.355、p.885-890

【非特許文献 6】

Yagi, T, および M. Takeichi 著、「Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity.」、Genes Dev.、2000年、Vol.14、p.1169-1180.

【非特許文献 7】

Farquhar, M.G., および G.E. Palade 著、「Junctional complexes in various epithelia.」、J. Cell Biol.、1963年、Vol.17、p.375-412

【非特許文献 8】

Provost, E., および D.L. Rimm 著、「Controversies at the cytoplasmic face of the cadherin-based adhesion complex.」、Curr. Opin. Cell Biol.、1999年、Vol.11、p.567-572

【非特許文献 9】

Nagafuchi, A. 著、「Molecular architecture of adherens junctions.」 Curr. Opin. Cell Biol.、2001年、Vol.13、p.600-603

【非特許文献 10】

Takeichi, M. 著、「Morphogenetic roles of classic cadherins.」、Curr. Opin. Cell Biol.、1995年、Vol.7、p.619-627

【非特許文献 11】

Ozawa, M. (外 2 名) 著、「The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species.」、EMBO J.、1989年、Vol.8、p.1711-1717

【非特許文献 12】

Nagafuchi, A. (外 2 名) 著、「The 102 kd cadherin-associated protein: similarity to vinculin and posttranscriptional regulation of expression.」、Cell、1991年、Vol.65、p.849-857

【非特許文献 13】

Watabe-Uchida, M. (外 9 名) 著、「 α -Catenin-vinculin interaction function

ns to organize the apical junctional complex in epithelial cells.」、J. Cell Biol.、1998年、Vol.142、p.847-857

【非特許文献 1 4】

Weiss, E.E. (外 4 名) 著、「Vinculin is part of the cadherin-catenin junctional complex: complex formation between alpha-catenin and vinculin.」、J. Cell Biol.、1998年、Vol.141、p.755-764

【非特許文献 1 5】

Rimm, D.L. (外 4 名) 著、「Alpha 1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex.」 Proc. Nat. Acad. Sci. USA.、1995年、Vol.92、p.8813-8817

【非特許文献 1 6】

Knudsen, K.A. (外 3 名) 著、「Interaction of alpha-actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via alpha-catenin.」、J. Cell Biol.、1995年、Vol.130、p.67-77

【非特許文献 1 7】

Imamura, Y. (外 4 名) 著、「Functional domains of alpha-catenin required for the strong state of cadherin-based cell adhesion.」 J.Cell Biol.、1999年、Vol.144、p.1311-1322

【非特許文献 1 8】

Mandai, K. (外 1 2 名) 著、「Afadin: A novel actin filament-binding protein with one PDZ domain localized at cadherin-based cell-to-cell adherens junction.」、J. Cell Biol.、1997年、Vol.139、p.517-528

【非特許文献 1 9】

Takahashi, K. (外 1 0 名) 著、「Nectin/PRR: an immunoglobulin-like cell adhesion molecule recruited to cadherin-based adherens junctions through interaction with Afadin, a PDZ domain-containing protein.」、J. Cell Biol.、1999年、Vol.145、p.539-549

【非特許文献 2 0】

Tsukita, S. (外 3 名) 著、「Molecular linkage between cadherins and actin

filaments in cell-cell adherens junctions.」、Curr. Opin. Cell Biol.、1992年、Vol.4、p.834-839

【非特許文献 2 1】

Aoki, J. (外 7 名) 著、「Mouse homolog of poliovirus receptor-related gene 2 product, mPRR2, mediates homophilic cell aggregation.」、Exp. Cell Res.、1997年、Vol.235、p.374-384

【非特許文献 2 2】

Lopez, M. (外 5 名) 著、「The human poliovirus receptor related 2 protein is a new hematopoietic/endothelial homophilic adhesion molecule.」、Blood、1998年、Vol.92、p.4602-4611

【非特許文献 2 3】

Miyahara, M. (外 5 名) 著、「Interaction of nectin with afadin is necessary for its clustering at cell-cell contact sites but not for its cis dimerization or trans interaction.」、J. Biol. Chem.、2000年、Vol.275、p.613-618

【非特許文献 2 4】

Satoh-Horikawa, K. (外 7 名) 著、「Nectin-3, a new member of immunoglobulin-like cell adhesion molecules that shows homophilic and heterophilic cell-cell adhesion activities.」、J. Biol. Chem.、2000年、Vol. 275、p.10291-10299

【非特許文献 2 5】

Reymond, N. (外 5 名) 著、2001年、「Nectin4/PRR4: A new afadin-associated member of the nectin family that trans-interacts with nectin1/PRR1 through V domain interaction.」、J. Biol. Chem.、Vol. 276、p.43205-43215

【非特許文献 2 6】

Morrison, M.E. および V.R. Racaniello 著、「Molecular cloning and expression of a murine homolog of the human poliovirus receptor gene.」、J. Virol.、1992年、Vol.66、p.2807-2813

【非特許文献 2 7】

Aoki, J. (外4名) 著、[Amino acid residues on human poliovirus receptor involved in interaction with poliovirus.]、J. Biol. Chem.、1994年、Vol. 269、p. 8431-8438

【非特許文献 2 8】

Eberle, F. (外4名) 著、[The human PRR2 gene, related to the human poliovirus receptor gene (PVR), is the true homolog of the murine MPH gene.]、Gene、1995年、Vol.159、p.267-272

【非特許文献 2 9】

Lopez, M. (外7名) 著、[Complementary DNA characterization and chromosomal localization of a human gene related to the poliovirus receptor-encoding gene.]、Gene、1995年、Vol.155、p.261-265

【非特許文献 3 0】

Cocchi, F. (外5名) 著、[The V domain of herpesvirus Ig-like receptor (HIgR) contains a major functional region in herpes simplex virus-1 entry into cells and interacts physically with the viral glycoprotein D.]、Proc. Natl. Acad. Sci. USA.、1998年、Vol.95、p.15700-15705

【非特許文献 3 1】

Cocchi, F. (外4名) 著、[Cell-to-cell spread of wild-type herpes simplex virus type 1, but not of syncytial strains, is mediated by the immunoglobulin-like receptors that mediate virion entry, nectin1 (PRR1/HveC/HIgR) and nectin2 (PRR2/HveB).]、J. Virol.、2000年、Vol.74、p.3909-3917

【非特許文献 3 2】

Geraghty, R.J. (外4名) 著、[Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor.]、Science、1998年、Vol.280、p.1618-1620

【非特許文献 3 3】

Warner, M.S. (外8名) 著、[A cell surface protein with herpesvirus entry activity (HveB) confers susceptibility to infection by mutants of herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2, and pseudorabies v

irus.」、Virology、1998年、Vol.246、p.179-189

【非特許文献 3 4】

Lopez, M. (外 5 名) 著、[Nectin2 α (PRR2 α or HveB) and nectin2 α are low-efficiency mediators for entry of herpes simplex virus mutants carrying the Leu25Pro substitution in glycoprotein D.」、J. Virol.、2000年、Vol.74、p.1267-1274

【非特許文献 3 5】

Sakisaka, T (外 9 名) 著、[Requirement of interaction of nectin-1 α /hvec with afadin for efficient cell-cell spread of herpes simplex virus type 1.」、J. Virol.、2001年、Vol.75、p.4734-4743

【非特許文献 3 6】

Ponting, C.P. 著、[AF-6/cno: neither a kinesin nor a myosin, but a bit of both.」、Trends Biochem. Sci.、1995年、Vol.20、p.265-266

【非特許文献 3 7】

Bohl, F. (外 4 名) 著、[She2p, a novel RNA-binding protein tethers ASH1 mRNA to the Myo4p myosin motor via She3p.」、EMBO J.、2000年、Vol.19、p.5514-5524

【非特許文献 3 8】

Long, R.M. (外 4 名) 著、[She2p is a novel RNA-binding protein that recruits the Myo4p-She3p complex to ASH1 mRNA.」、EMBO J.、2000年、Vol.19、p.6592-6601

【非特許文献 3 9】

Prasad, R. (外 1 2 名) 著、[Cloning of the ALL-1 fusion partner, the AF-6 gene, involved in acute myeloid leukemias with the t(6;11) chromosome translocation.」、Cancer Res.、1993年、Vol.53、p.5624-5628

【非特許文献 4 0】

Tachibana, K. (外 8 名) 著、[Two cell adhesion molecules, nectin and cadherin, interact through their cytoplasmic domain-associated proteins.」、J. Cell Biol.、2000年、Vol.150、p.1161-1176

【非特許文献 4 1】

Fukuhara, A. (外 1 4 名) 著、[Involvement of Nectin in the Localization of Junctional Adhesion Molecule at Tight Junctions Oncogene.]、In press、2002年

【非特許文献 4 2】

Yokoyama, S. (外 8 名) 著、[alpha-Catenin-independent Recruitment of ZO-1 to Nectin-based Cell-Cell Adhesion Sites through Afadin.]、Mol. Biol. Cell.、2001年、Vol.12、p.1595-1609

【非特許文献 4 3】

Fukuhara, A. (外 7 名) 著、[Role of Nectin in Organization of Tight Junctions in Epithelial Cells. Genes Cells.]、In press、2002年

【非特許文献 4 4】

Furuse, M. (外 3 名) 著、[A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts.]、J. Cell Biol.、1998年、Vol.143、p.391-401

【非特許文献 4 5】

Furuse, M. (外 4 名) 著、[Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin.]、J. Cell Biol.、1998年、Vol.141、p.1539-1550

【非特許文献 4 6】

Tsukita, S. および M. Furuse 著、[Occludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players?]、Trends Cell Biol.、1999年、Vol.9、p.268-273

【非特許文献 4 7】

Tsukita, S. (外 2 名) 著、[Structural and signalling molecules come together at tight junctions.]、Curr. Opin. Cell Biol.、1999年、Vol.11、p.628-633

【非特許文献 4 8】

Martin-Padura, I. (外 1 1 名) 著、[Junctional adhesion molecule, a novel

member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration.」、J. Cell Biol.、1998年、Vol.142、p.117-127

【非特許文献 4 9】

Stevenson, B.R. (外3名) 著、「Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia.」、J. Cell Biol.、1986年、Vol.103、p.755-766

【非特許文献 5 0】

Itoh, M. (外5名) 著、「The 220-kD protein colocalizing with cadherins in non-epithelial cells is identical to ZO-1, a tight junction-associated protein in epithelial cells: cDNA cloning and immunoelectron microscopy.」、J Cell Biol.、1993年、Vol.121、p.491-502

【非特許文献 5 1】

Itoh, M. (外3名) 著、「Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments.」J. Cell Biol.、1997年、Vol.138、p.181-192

【非特許文献 5 2】

Itoh, M. (外2名) 著、「Characterization of ZO-2 as a MAGUK family member associated with tight as well as adherens junctions with a binding affinity to occludin and alpha catenin.」、J Biol. Chem.、1999年、Vol.274、p.5981-5986

【非特許文献 5 3】

Itoh, M. (外5名) 著、「Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins.」、J. Cell Biol.、1999年、Vol.147、p.1351-1363

【非特許文献 5 4】

Willott, E. (外5名) 著、「The tight junction protein ZO-1 is homologous to the Drosophila discs-large tumor suppressor protein of septate junctions.」、Proc. Natl. Acad. Sci. USA.、1993年、Vol.90、p.7834-7838

【非特許文献 5 5】

Furuse, M. (外 6 名) 著、[Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions.]、J. Cell Biol.、1994年、Vol.127、p.1617-1626

【非特許文献 5 6】

Haskins, J. (外 4 名) 著、[ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin.]、J. Cell Biol.、1998年、Vol.141、p.199-208

【非特許文献 5 7】

Bazzoni, G. (外 5 名) 著、[Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin.]、J. Biol. Chem.、2000年、Vol.275、p.20520-20526

【非特許文献 5 8】

Ebnet, K. (外 4 名) 著、[Junctional adhesion molecule interacts with the PDZ domain-containing proteins AF-6 and ZO-1.]、J. Biol. Chem.、2000年、Vol.275、p.27979-27988

【非特許文献 5 9】

Wittchen, E.S. (外 2 名) 著、[Exogenous expression of the amino-terminal half of the tight junction protein ZO-3 perturbs junctional complex assembly.]、J. Cell Biol.、2000年、Vol.151、p.825-836

【非特許文献 6 0】

Itoh, M. (外 5 名) 著、[Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions.]、J. Cell Biol.、2001年、Vol.154、p.491-497

【非特許文献 6 1】

Ikeda, W. (外 1 2 名) 著、[Afadin: A key molecule essential for structural organization of cell-cell junctions of polarized epithelia during embryogenesis.]、J. Cell Biol.、1999年、Vol.146、p.1117-1132

【非特許文献 6 2】

Suzuki, K. (外 6 名) 著、[Mutations of PVRL1, encoding a cell-cell adhesion molecule/herpesvirus receptor, in cleft lip/palate-ectodermal dysplasia.]、Nat. Genet.、2000年、Vol.25、p.427-430

【非特許文献 6 3】

Mizoguchi, A. (外 1 3 名) 著、[Nectin: an adhesion molecule involved in formation of synapses.]、J Cell Biol.、2002年、Vol.156、p.555-565

【非特許文献 6 4】

Ozaki-Kuroda, K. (外 1 1 名) 著、[Nectin couples cell-cell adhesion and actin scaffold at heterotypic adherens junction in testis.]、Curr. Biol.、2002年、Vol.13、p.1145-1150

【0 0 1 1】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は新規なアフアディン DILドメイン結合性タンパク質(ADIP)遺伝子を提供することにある。また、本発明は、このようにして同定された新規なADIPの用途を提供することをも目的とする。

【0 0 1 2】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を行った。まず本発明者らは、ネクチンおよびアフアディン系がどのようにAJsおよびTJsを組織化するか の洞察を得るために、酵母ツーハイブリッドスクリーニングにより、アフアディン結合タンパク質の同定を行った。そして、ベイトとしてアフアディンのDILドメインを使用し、該ドメインに結合する、新規なアフアディン結合タンパク質であるADIP (アフアディンDILドメイン相互作用タンパク質) を同定することに成功した。

【0 0 1 3】

ADIPはさらに、 α -カテニンへの直接的な結合を介し、E-カドヘリンと間接的に会合することが知られているF-アクチン束形成タンパク質である α -アクチニンと結合することが判明した (Knudsen, K.A., A.P. Soler, K.R. Johnson, and

M.J. Wheelock. 1995. Interaction of alpha-actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via alpha-catenin. J. Cell Biol. 130:67-77.)。この結果より、ADIPは α -アクチニンを通して、ネクチン-アファディンおよびE-カドヘリン-カテニン系に接続し、アファディンおよび α -アクチニンを通して、AJsにおけるアクチン細胞骨格の組織化に関与することが示唆された。このことから、ADIPはアクチン骨格を制御する薬剤を評価する際に有用であると考えられる。

【0014】

また、ADIPは心筋細胞の介在板において非常に強い発現を示したことから、心筋梗塞や心筋炎等の心臓疾患における介在板の機能マーカーとして有効である可能性が考えられる。

【0015】

即ち本発明は、新規ADIP遺伝子およびその利用に関し、より具体的には、

〔1〕 下記(a)から(d)のいずれかに記載のポリヌクレオチド、

(a)配列番号：2または4に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド、

(b)配列番号：1または3に塩基配列のコード領域を含むポリヌクレオチド、

(c)配列番号：2または4に記載のアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなり、アファディンまたはアクチニンとの結合活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

(d)配列番号：1または3に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、アファディンまたはアクチニンとの結合活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド、

〔2〕 〔1〕に記載のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、

〔3〕 〔1〕に記載のポリヌクレオチドが挿入されたベクター、

〔4〕 〔1〕に記載のポリヌクレオチドまたは〔3〕に記載のベクターを保持する宿主細胞、

〔5〕 〔4〕に記載の宿主細胞を培養し、該宿主細胞またはその培養上清から

、産生させたポリペプチドを回収する工程を含む、〔2〕に記載のポリペプチドの製造方法、

〔6〕 〔1〕に記載のポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を持つポリヌクレオチド、

〔7〕 〔1〕に記載のポリヌクレオチドもしくはその一部に対するアンチセンスポリヌクレオチド、

〔8〕 〔2〕に記載のポリペプチドに結合する抗体、

〔9〕 以下の(a)～(c)の工程を含む、アクチン骨格を制御する薬剤のための候補化合物のスクリーニング方法、

(a) アファディンまたはアクチニンと、〔2〕に記載のポリペプチドおよび被検化合物を接触させる工程、

(b) アファディンまたはアクチニンと、〔2〕に記載のポリペプチドとの結合活性を測定する工程、

(c) 被検化合物を接触させない場合と比較して、上記結合活性を変化させる化合物を選択する工程

〔10〕 被検者における〔2〕に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を検出することを特徴とする、心臓疾患の検査方法、

〔11〕 以下の(a)～(c)の工程を含む、〔10〕に記載の検査方法、

(a) 被検者の心筋細胞からRNA試料を調製する工程

(b) 該RNA試料に含まれる〔2〕に記載のポリペプチドをコードするRNAの量を測定する工程

(c) 測定されたRNAの量を対照と比較する工程

〔12〕 以下の(a)～(c)の工程を含む、〔10〕に記載の検査方法、

(a) 被検者の心筋細胞からタンパク質試料を調製する工程

(b) 該タンパク質試料に含まれる〔2〕に記載のポリペプチドの量を測定する工程

(c) 測定されたポリペプチドの量を対照と比較する工程

〔13〕 心臓疾患が心筋梗塞または心筋炎である、〔10〕～〔12〕のいずれ

れかに記載の疾患、を提供するものである。

【0016】

【発明の実施の形態】

本発明は、アファディンDILドメインに結合する新規なタンパク質であるADIPをコードするポリヌクレオチドを提供する。本発明に含まれる、本発明者らにより同定されたマウスADIPをコードするポリヌクレオチドの塩基配列を配列番号：1に、該ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号：2に示す。また本発明に含まれる、本発明者らによって同定されたラットADIPをコードするポリヌクレオチドの塩基配列を配列番号：3に、該ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号：4に示す。

【0017】

本発明はまた、本発明者らにより同定されたポリペプチドと機能的に同等なポリペプチド、および該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに関する。ここで「機能的に同等」とは、対象となるポリペプチドが本発明者らにより同定されたポリペプチドと同等の生物学的特性を有していることを意味する。ADIPが持つ生物学的特性としては、アファディン、および／またはアクチニンと結合する活性を例示することができる。従って、本発明には、配列番号：2または4に記載のアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなり、アファディンまたはアクチニンとの結合活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドが含まれる。さらに、配列番号：1または3に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、アファディンまたはアクチニンとの結合活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドも本発明に含まれる。上記「結合活性」の測定は、当業者においては周知の方法、例えば、酵母ツーハイブリッド系等により実施することができる。なお、本発明において「アクチニン」とは、通常、「 α -アクチニン」を指す。

【0018】

本発明のポリヌクレオチドは、当業者においては、一般的に公知の方法により

単離することが可能である。例えば、ハイブリダイゼーション技術 (Southern, EM., J Mol Biol, 1975, 98, 503.) やポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 技術 (Saiki, RK. et al., Science, 1985, 230, 1350., Saiki, RK. et al., Science 1988, 239, 487.) を利用する方法が挙げられる。すなわち、配列番号：1 または 3 に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドもしくはその一部をプローブとして、また配列番号：1 または 3 に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドをプライマーとして、他の動物（例えば、ヒト等）から配列番号：1 または 3 に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドと高い相同性を有するポリヌクレオチドを単離することは、当業者にとって通常行い得ることである。このように、ハイブリダイゼーション技術やPCR技術によって単離し得る、配列番号：1 または 3 に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドもまた本発明のポリヌクレオチドに含まれる。このようなポリヌクレオチドとしては、例えば、ADIP のヒトホモログをコードするポリヌクレオチドが挙げられる。

【0019】

上記ポリヌクレオチドを単離するためには、好ましくはストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーション反応を行う。本発明においてストリンジェントなハイブリダイゼーション条件とは、6M 尿素、0.4% SDS、0.5×SSC の条件またはこれと同等のストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件を指す。よりストリンジェンシーの高い条件、例えば、6M 尿素、0.4% SDS、0.1×SSC の条件下では、より相同性の高いポリヌクレオチドを単離できることが期待される。こうして単離されたポリヌクレオチドは、アミノ酸レベルにおいて、配列番号：2 または 4 に記載のアミノ酸配列と高い相同性を有すると考えられる。高い相同性とは、アミノ酸配列全体で少なくとも 70% 以上、好ましくは 80% 以上、さらに好ましくは 90% 以上、最も好ましくは 95% 以上の配列の同一性を指す。

【0020】

アミノ酸配列や塩基配列の同一性は、カーリンおよびアルチュールによるアルゴリズム BLAST (Proc. Natl. Acad. Sei. USA, 1990, 87, 2264-2268., Karlin, S. & Altschul, SF., Proc. Natl. Acad. Sei. USA, 1993, 90, 5873.) を用い

て決定できる。BLASTのアルゴリズムに基づいたBLASTNやBLASTXと呼ばれるプログラムが開発されている (Altschul, SF. et al., J Mol Biol, 1990, 215, 403.)。BLASTNを用いて塩基配列を解析する場合は、パラメーターは、例えばscore=100、wordlength=12とする。また、BLASTXを用いてアミノ酸配列を解析する場合は、パラメーターは、例えばscore=50、wordlength=3とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合は、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

【 0 0 2 1 】

本発明のポリヌクレオチドには、ゲノムDNA、cDNAおよび化学合成DNAが含まれる。ゲノムDNAおよびcDNAの調製は、当業者にとって常套手段により行うことが可能である。ゲノムDNAは、例えば、ADIPをコードするポリヌクレオチドを有する生物からゲノムDNAを抽出し、ゲノミックライブラリー（ベクターとしては、例えば、プラスミド、ファージ、コスミド、BAC、PACなどが利用できる）を作製し、これを展開して、本発明のADIPをコードするポリヌクレオチド（例えば、配列番号：1または3）を基に調製したプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーションあるいはプラークハイブリダイゼーションを行うことで調製できる。また、本発明のADIPをコードするポリヌクレオチド（例えば、配列番号：1または3）に特異的なプライマーを作製し、これを利用したPCRを行って調製することも可能である。cDNAは、例えば、ADIPをコードするポリヌクレオチドを有する生物から抽出したmRNAを基にcDNAを合成し、これをλZAPなどのベクターに挿入してcDNAライブラリーを作製し、これを展開して、上記と同様にコロニーハイブリダイゼーションあるいはプラークハイブリダイゼーションを行うことで、またPCRを行うことにより調製できる。

【 0 0 2 2 】

また、本発明は、配列番号：2または4に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と構造的に類似しているタンパク質をコードするポリヌクレオチドも提供する。このようなポリヌクレオチドとしては、該タンパク質において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からな

るタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドが挙げられる。上記タンパク質におけるアミノ酸の変異数や変異部位は、その機能が保持される限り制限はない。変異数は、典型的には、全アミノ酸の10%以内であり、好ましくは全アミノ酸の5%以内であり、さらに好ましくは全アミノ酸の1%以内であると考えられる。

【0023】

上記ポリヌクレオチドを調製するために、当業者によく知られた方法としては、上記したハイブリダイゼーション技術やポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術の他に、例えば、該ポリヌクレオチドに対し、site-directed mutagenesis法(Kramer, W. & Fritz, HJ., Methods Enzymol, 1987, 154, 350.)により変異を導入する方法が挙げられる。また、自然界においても、塩基配列の変異によりコードするタンパク質のアミノ酸配列が変異することは起こり得ることである。また、塩基配列が変異していても、その変異がタンパク質中のアミノ酸の変異を伴わない場合(縮重変異)があり、このような縮重変異ポリヌクレオチドも本発明に含まれる。また、本発明の上記ポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドもまた本発明に含まれる。

【0024】

本発明は、本発明のポリヌクレオチドが挿入されたベクター、本発明のポリヌクレオチドまたは該ベクターを保持する宿主細胞、および該宿主細胞を利用した本発明のポリペプチドの製造方法を提供する。

【0025】

本発明のベクターとしては、挿入したDNAを安定に保持するものであれば特に制限されず、例えば宿主に大腸菌を用いるのであれば、クローニング用ベクターとしてはpBluescriptベクター(Stratagene社製)などが好ましい。本発明のポリペプチドを生産する目的においてベクターを用いる場合には、特に発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、試験管内、大腸菌内、培養細胞内、生物個体内でポリペプチドを発現するベクターであれば特に制限されないが、例えば、試験管内発現であればpBESTベクター(プロメガ社製)、大腸菌であればpETベクター(Invitrogen社製)、培養細胞であればpME18S-FL3ベクター(GenBank Ac

cession No. AB009864)、生物個体であればpME18Sベクター (Mol Cell Biol. 8 :466-472(1988)) などが好ましい。ベクターへの本発明のDNAの挿入は、常法により、例えば、制限酵素サイトを用いたリガーゼ反応により行うことができる (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4-11.11)。

【 0 0 2 6 】

本発明のベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、目的に応じて種々の宿主細胞が用いられる。ポリペプチドを発現させるための細胞としては、例えば、細菌細胞 (例：ストレプトコッカス、スタフィロコッカス、大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌)、真菌細胞 (例：酵母、アスペルギルス)、昆虫細胞 (例：ドロソフィラS2、スポドプテラSF9)、動物細胞 (例：CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、HEK293、Bowes メラノーマ細胞) および植物細胞を例示することができる。宿主細胞へのベクター導入は、例えば、リン酸カルシウム沈殿法、電気パルス穿孔法 (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 9.1-9.9)、リポフェクタミン法 (GIBCO-BRL社製)、マイクロインジェクション法などの公知の方法で行うことが可能である。

【 0 0 2 7 】

宿主細胞において発現したポリペプチドを小胞体の内腔に、細胞周辺腔に、または細胞外の環境に分泌させるために、適当な分泌シグナルを目的のポリペプチドに組み込むことができる。これらのシグナルは目的のポリペプチドに対して内因性であっても、異種シグナルであってもよい。

【 0 0 2 8 】

本発明のポリペプチドの回収は、本発明のポリペプチドが培地に分泌される場合は、培地を回収する。本発明のポリペプチドが細胞内に産生される場合は、その細胞をまず溶解し、その後にポリペプチドを回収する。

【 0 0 2 9 】

組換え細胞培養物から本発明のポリペプチドを回収し精製するには、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマト

グラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含めた公知の方法を用いることができる。

【0030】

本発明は、本発明者らにより同定されたポリヌクレオチド（配列番号：1または3に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドまたはその相補鎖）に相補的な、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するヌクレオチドを提供する。ここで「相補鎖」とは、A:T（ただしRNAの場合は U）、G:Cの塩基対からなる2本鎖核酸の一方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、少なくとも15個の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上の塩基配列上の相同性を有すればよい。相同性を決定するためのアルゴリズムは本明細書に記載したものを使用すればよい。このようなヌクレオチドは、本発明のポリヌクレオチドを検出、単離するためのプローブとして、また、本発明のヌクレオチドを増幅するためのプライマーとして利用することが可能である。プライマーとして用いる場合には、通常、15～100ヌクレオチド、好ましくは15～35ヌクレオチドの鎖長を有する。また、プローブとして用いる場合には、本発明のDNAの少なくとも一部若しくは全部の配列を含む少なくとも15ヌクレオチド、好ましくは少なくとも30ヌクレオチドの鎖長のポリヌクレオチドが用いられる。このようなポリヌクレオチドは、好ましくは本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズするものである。「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリンジエントな条件下で、本発明者らにより同定されたポリヌクレオチド（配列番号：1または3）とハイブリダイズし、他のポリペプチドをコードするDNAとはハイブリダイズしないことを意味する。

【0031】

また、このポリヌクレオチドには、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現を抑制するポリヌクレオチドが含まれる。このようなポリヌクレオチドに

は、アンチセンスポリヌクレオチド（アンチセンスDNA/RNA；本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写産物と相補的なアンチセンスRNA、および該RNAをコードするDNA）やリボザイム（本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写産物を特異的に開裂するリボザイム活性を有するRNAをコードするDNA）が含まれる。

【0032】

アンチセンスポリヌクレオチドが標的遺伝子の発現を抑制する作用としては、以下のような複数の要因が存在する。すなわち、三重鎖形成による転写開始阻害、RNAポリメラーゼによって局所的に開状ループ構造がつけられた部位とのハイブリッド形成による転写抑制、合成の進みつつあるRNAとのハイブリッド形成による転写阻害、イントロンとエキソンとの接合点でのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、スプライソソーム形成部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、mRNAとのハイブリッド形成による核から細胞質への移行抑制、キャッピング部位やポリ(A)付加部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、翻訳開始因子結合部位とのハイブリッド形成による翻訳開始抑制、開始コドン近傍のリボソーム結合部位とのハイブリッド形成による翻訳抑制、mRNAの翻訳領域やポリソーム結合部位とのハイブリッド形成によるペプチド鎖の伸長阻止、および核酸とタンパク質との相互作用部位とのハイブリッド形成による遺伝子発現抑制などである。これらは、転写、スプライシング、または翻訳の過程を阻害して、標的遺伝子の発現を抑制する(平島および井上「新生化学実験講座2 核酸IV 遺伝子の複製と発現」, 日本生化学会編, 東京化学同人, pp. 319-347, 1993)。

【0033】

本発明で用いられるアンチセンスポリヌクレオチドは、上記のいずれの作用で標的遺伝子の発現を抑制してもよい。一つの態様としては、遺伝子のmRNAの5'端近傍の非翻訳領域に相補的なアンチセンス配列を設計すれば、遺伝子の翻訳阻害に効果的と考えられる。しかし、コード領域もしくは3'側の非翻訳領域に相補的な配列も使用し得る。このように、遺伝子の翻訳領域だけでなく非翻訳領域の配列のアンチセンス配列を含むポリヌクレオチドも、本発明で利用されるアンチセ

ンスポリヌクレオチドに含まれる。使用されるアンチセンスポリヌクレオチドは、適当なプロモーターの下流に連結され、好ましくは3'側に転写終結シグナルを含む配列が連結される。アンチセンスポリヌクレオチド配列は、標的遺伝子またはその一部と相補的な配列であることが好ましいが、遺伝子の発現を有効に阻害できる限り、完全に相補的でなくてもよい。転写されたRNAは、標的とする遺伝子の転写産物に対して好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の相補性を有する。アンチセンス配列を用いて、効果的に標的遺伝子の発現を阻害するには、アンチセンスポリヌクレオチドは、アンチセンス効果を引き起こすために、少なくとも15ヌクレオチド以上、好ましくは100ヌクレオチド、さらに好ましくは500ヌクレオチド以上の鎖長を有し、通常、3000ヌクレオチド以内、好ましくは2000ヌクレオチド以内の鎖長を有する。

【0034】

該アンチセンスポリヌクレオチドは、例えば、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、配列番号：1または3）の配列情報を基にホスホロチオネート法（Stein, 1988 Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides. Nucleic Acids Res 16, 3209-21 (1988)) などにより調製することが可能である。

【0035】

内在性遺伝子の発現の抑制は、また、リボザイムをコードするポリヌクレオチドを利用して行うことも可能である。リボザイムとは触媒活性を有するRNA分子のことをいう。リボザイムには種々の活性を有するものがあるが、中でもRNAを切断する酵素としてのリボザイムの研究により、RNAの部位特異的な切断を目的とするリボザイムの設計が可能となった。リボザイムには、グループIイントロン型や、RNasePに含まれるMIRNAのように400ヌクレオチド以上の大きさのものもあるが、ハンマーヘッド型やヘアピン型と呼ばれる40ヌクレオチド程度の活性ドメインを有するものもある（小泉誠および大塚栄子，（1990）蛋白質核酸酵素, 35: 2191）。

【0036】

例えば、ハンマーヘッド型リボザイムの自己切断ドメインは、G13U14C15のC15

の3'側を切断するが、活性にはU14が9位のAと塩基対を形成することが重要とされ、15位の塩基はCの他にAまたはUでも切断されることが示されている(M.Koizumiら, (1988) FEBS Lett. 228:225)。リボザイムの基質結合部を標的部位近傍のRNA配列と相補的になるように設計すれば、標的RNA中のUC、UUまたはUAという配列を認識する制限酵素的なRNA切断リボザイムを作出することが可能である(M.Koizumiら, (1988) FEBS Lett. 239:285、小泉誠および大塚栄子, (1990) 蛋白質核酸酵素, 35:2191、M.Koizumiら, (1989) Nucleic Acids Res. 17:7059)。

【0037】

また、ヘアピン型リボザイムも、本発明の目的のために有用である。ヘアピン型リボザイムは、例えばタバコリングスポットウイルスのサテライトRNAのマイナス鎖に見出される(J.M.Buzayan Nature 323:349, 1986)。このリボザイムも、標的特異的なRNA切断を起こすように設計できることが示されている(Y.Kikuchi および N.Sasaki (1992) Nucleic Acids Res. 19:6751、菊池洋, (1992) 化学と生物 30:112)。

【0038】

本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現を抑制するポリヌクレオチドは、遺伝子治療に用いる場合には、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどのウイルスベクターやリポソームなどの非ウイルスベクターなどを利用して、ex vivo法やin vivo法などにより患者へ投与を行うことが考えられる。

【0039】

本発明は、本発明のポリペプチドに結合する抗体を提供する。ここで「抗体」には、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体、さらにFabまたは他の免疫グロブリン発現ライブラリーの産物を含むFabフラグメントが含まれる。

【0040】

本発明のポリペプチドまたはその断片もしくは類似体、またはそれらを発現する細胞は、本発明のポリペプチドに結合する抗体を産生するための免疫原としても使用することができる。抗体は、好ましくは、本発明のポリペプチドに免疫特

異的である。「免疫特異的」とは、その抗体が他のポリペプチドに対するその親和性よりも本発明のポリペプチドに対して実質的に高い親和性を有することを意味する。

【0041】

本発明のポリペプチドに結合する抗体は、当業者に公知の方法により調製することが可能である。ポリクローナル抗体であれば、例えば、次のようにして得ることができる。本発明のポリペプチドあるいはそのGSTとの融合タンパク質をウサギ等の小動物に免疫し血清を得る。これを、例えば、硫酸沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、本発明のポリペプチドをカップリングしたアフィニティーカラム等により精製することにより調製する。また、モノクローナル抗体であれば、例えば、本発明のポリペプチドをマウスなどの小動物に免疫を行い、同マウスより脾臓を摘出し、これをすりつぶして細胞を分離し、マウスミエローマ細胞とポリエチレングリコールなどの試薬により融合させ、これによりできた融合細胞（ハイブリドーマ）の中から、本発明のポリペプチドに結合する抗体を産生するクローンを選択する。次いで、得られたハイブリドーマをマウス腹腔内に移植し、同マウスより腹水を回収し、得られたモノクローナル抗体を、例えば、硫酸沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、本発明のポリペプチドをカップリングしたアフィニティーカラム等により精製することで、調製することが可能である。

【0042】

本発明の抗体は、本発明のポリペプチドやこれを発現する細胞の単離、同定、および精製に利用することができる。

【0043】

本発明のポリペプチドは、アクチン骨格を制御する薬剤のための候補化合物のスクリーニングにおいて使用することができる。アクチン骨格を制御する薬剤は、本発明のポリペプチドの発現（機能）異常に関連した疾患の治療薬となり得る。同定の対象となる分子は、天然由来であっても、人工的に合成された構造的または機能的な模擬物であってもよい。本発明のポリペプチドは多くの病理を含めて多数の生物学的機能に関与しているものと考えられる。従って、本発明のポリ

ペプチドを活性化する化合物および本発明のポリペプチドの活性化を阻害し得る化合物を発見することが望まれる。

【 0 0 4 4 】

本発明は、アクチン骨格を制御する薬剤のための候補化合物のスクリーニング方法を提供する。

【 0 0 4 5 】

本方法においては、まず、アフアディンまたはアクチニンと、本発明のポリペプチドおよび候補化合物とを接触させ、次いで、アフアディンまたはアクチニンと、本発明のポリペプチドとの結合活性を測定する。そして、被検化合物を接触させない場合と比較して、上記結合活性を変化させる（増加または抑制させる）化合物を選択する。

【 0 0 4 6 】

本発明の上記スクリーニング方法により、本発明のポリペプチドのアフアディンまたはアクチニンへの結合活性を変化させる化合物として単離される化合物は、例えば、心筋梗塞や心筋炎等の心臓疾患に対する治療薬となるものと期待される。また、該化合物は被検化合物として、本発明の上記スクリーニング方法に供することもできる。

【 0 0 4 7 】

上記結合活性の測定は、当業者においては周知の方法、例えば、酵母ツーハイブリッドシステム等により、適宜実施することができる。被検化合物としては、特に制限はなく、例えば、種々の公知化合物やペプチド（例えば、ケミカルファイルに登録されているもの）あるいはファージ・ディスプレイ法（J. Mol. Biol. (1991) 222, 301-310）などを応用して作成されたランダム・ペプチド群を用いることができる。また、微生物の培養上清や、植物、海洋生物由来の天然成分などもスクリーニングの対象となる。その他、生体組織抽出物、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物などが挙げられるが、これらに特に制限されない。

【 0 0 4 8 】

また本発明は、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現の異常に関連した疾患の検査方法に関する。本発明のポリペプチドは、生体内で重要な機能を

有すると考えられ、その発現の異常は、種々の疾患の原因となり得る。従って、本発明のポリペプチドの発現を指標とすることにより、このような疾患の検査を行うことも可能である。

【 0 0 4 9 】

本発明において「疾患の検査」とは、疾患の症状を呈している被検者の治療戦略を立てるための検査のみならず、被検者が疾患にかかりやすいか否かを判断するために行う予防のための検査、または既に罹患しているか否かの検査も含まれる。

【 0 0 5 0 】

ADIPは心筋細胞の介在板で非常に強く発現していることから、ADIPの発現異常により心臓疾患を引き起こす可能性が考えられる。従って、本発明の上記疾患とは、通常、心臓疾患であり、より具体的には、心筋梗塞または心筋炎を例示することができる。

【 0 0 5 1 】

本発明の検査方法の一つの態様は、被検者における本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域における変異を検出することを含む方法である。

【 0 0 5 2 】

一つの方法は、被検者における本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域の塩基配列を直接決定することによって検査を行う方法である。この方法においては、まず、被検者からDNA試料を調製する。DNA試料は、被検者の細胞、例えば心筋細胞から抽出した染色体DNAあるいはRNAを基に調製することができる。染色体DNAから本方法のDNA試料を調製するには、例えば染色体DNAを適当な制限酵素で切断し、ベクターにクローニングして、ゲノムライブラリーを作製すればよい。RNAから本方法のDNA試料を調製するには、例えば、逆転写酵素を用いて、RNAからcDNAライブラリーを作製すればよい。本方法においては、次いで、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域を含むDNAを単離する。該DNAの単離は、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域を含むDNAにハイブリダイズするプローブを用いて、ゲ

ノムライブラリーやcDNAライブラリーのスクリーニングをすることにより行うことができる。また、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域を含むDNAにハイブリダイズするプライマーを用いて、ゲノムDNAライブラリー、cDNAライブラリー、あるいはRNAを鋳型としたPCRによって単離することもできる。本方法においては、次いで、単離したDNAの塩基配列を決定する。選択したDNAの塩基配列の決定は、当業者に公知の方法で行うことができる。本方法においては、次いで、決定したDNAの塩基配列を、対照と比較する。本方法における「対照」とは、正常な（野生型の）本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域を含むDNAの塩基配列を言う。このような比較の結果、被検者のDNAの塩基配列が対照と異なっていた場合には、被検者は、疾患に罹患しているまたは発症の危険があると判定される。

【 0 0 5 3 】

本発明の検査方法は、上記の如く直接被検者由来のDNAの塩基配列を決定する方法以外に、種々の方法を用いることができる。

【 0 0 5 4 】

その一つの方法においては、まず、被検者からDNA試料を調製する。次いで、調製したDNA試料を制限酵素により切断する。次いで、DNA断片をその大きさに応じて分離する。次いで、検出されたDNA断片の大きさを、対照と比較する。また、他の一つの態様においては、まず、被検者からDNA試料を調製する。次いで、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域を含むDNAを増幅する。さらに、増幅したDNAを制限酵素により切断する。次いで、DNA断片をその大きさに応じて分離する。次いで、検出されたDNA断片の大きさを、対照と比較する。

【 0 0 5 5 】

このような方法としては、例えば、制限酵素断片長多型（Restriction Fragment Length Polymorphism／RFLP）を利用した方法やPCR－RFLP法等が挙げられる。具体的には、制限酵素の認識部位に変異が存在する場合、あるいは制限酵素処理によって生じるDNA断片内に塩基挿入または欠失がある場合、制限酵素処理後に生じる断片の大きさが対照と比較して変化する。この変異を含む部分をPCR法

によって増幅し、それぞれの制限酵素で処理することによって、これらの変異を電気泳動後のバンドの移動度の差として検出することができる。あるいは、染色体DNAをこれらの制限酵素によって処理し、電気泳動した後、本発明のプローブDNAを用いてサザンブロッティングを行うことにより、変異の有無を検出することができる。用いられる制限酵素は、それぞれの変異に応じて適宜選択することができる。この方法では、ゲノムDNA以外にも被検者から調製したRNAを逆転写酵素でcDNAにし、これをそのまま制限酵素で切断した後、サザンブロッティングを行うことも可能である。また、このcDNAを鋳型としてPCRで本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域を含むDNAを増幅し、それを制限酵素で切断した後、移動度の差を調べることも可能である。

【 0 0 5 6 】

別の方法は、まず、被検者からDNA試料を調製する。次いで、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域を含むDNAを増幅する。さらに、増幅したDNAを一本鎖DNAに解離させる。次いで、解離させた一本鎖DNAを非変性ゲル上で分離する。分離した一本鎖DNAのゲル上での移動度を対照と比較する。

【 0 0 5 7 】

このような方法としては、例えばPCR-SSCP(single-strand conformation polymorphism、一本鎖高次構造多型)法(Cloning and polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism analysis of anonymous Alu repeats on chromosome 11. Genomics. 1992 Jan 1; 12(1): 139-146.、Detection of p53 gene mutations in human brain tumors by single-strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products. Oncogene. 1991 Aug 1; 6(8): 1313-1318.)が挙げられる。この方法は操作が比較的簡便であり、また被検試料の量も少なく済む等の利点を有するため、特に多数のDNA試料をスクリーニングするのに好適である。その原理は次の通りである。二本鎖DNA断片を一本鎖に解離すると、各鎖はその塩基配列に依存した独自の高次構造を形成する。この解離したDNA鎖を、変性剤を含まないポリアクリルアミドゲル中で電気泳動すると、それぞれの高次構造の差に応じて、相補的な同じ鎖長の一本鎖

DNAが異なる位置に移動する。一塩基の置換によってもこの一本鎖DNAの高次構造は変化し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動において異なる移動度を示す。従って、この移動度の変化を検出することによりDNA断片に点突然変異や欠失、あるいは挿入等による変異が存在することを検出することができる。

【 0 0 5 8 】

具体的には、まず、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域を含むDNAをPCR法等によって増幅する。増幅される範囲としては、通常200～400bp程度の長さが好ましい。PCRは、当業者においては反応条件等を適宜選択して行うことができる。PCRの際に、³²P等のアイソトープ、蛍光色素、またはビオチン等によって標識したプライマーを用いることにより、増幅DNA産物を標識することができる。あるいはPCR反応液に³²P等のアイソトープ、蛍光色素、またはビオチン等によって標識された基質塩基を加えてPCRを行うことにより、増幅DNA産物を標識することも可能である。さらに、PCR反応後にクレノウ酵素等を用いて、³²P等のアイソトープ、蛍光色素、またはビオチン等によって標識された基質塩基を、増幅DNA断片に付加することによっても標識を行うことができる。こうして得られた標識されたDNA断片を、熱を加えること等により変性させ、尿素などの変性剤を含まないポリアクリルアミドゲルによって電気泳動を行う。この際、ポリアクリルアミドゲルに適量（5から10%程度）のグリセロールを添加することにより、DNA断片の分離の条件を改善することができる。また、泳動条件は各DNA断片の性質により変動するが、通常、室温（20から25℃）で行い、好ましい分離が得られないときには4から30℃までの温度で最適の移動度を与える温度の検討を行う。電気泳動後、DNA断片の移動度を、X線フィルムを用いたオートラジオグラフィーや、蛍光を検出するスキャナー等で検出し、解析を行う。移動度に差があるバンドが検出された場合、このバンドを直接ゲルから切り出し、PCRによって再度増幅し、それを直接シーケンシングすることにより、変異の存在を確認することができる。また、標識したDNAを使わない場合においても、電気泳動後のゲルをエチジウムブロマイドや銀染色法などによって染色することによって、バンドを検出することができる。

【 0 0 5 9 】

さらに別の方法は、まず、被検者からDNA試料を調製する。次いで、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域を含むDNAを増幅する。さらに、増幅したDNAを、DNA変性剤の濃度が次第に高まるゲル上で分離する。次いで、分離したDNAのゲル上での移動度を対照と比較する。

【0060】

このような方法としては、例えば、変性剤濃度勾配ゲル（denaturant gradient gel electrophoresis：DGGE法）等を例示することができる。DGGE法は、変性剤の濃度勾配のあるポリアクリルアミドゲル中で、DNA断片の混合物を泳動し、それぞれの不安定性の違いによってDNA断片を分離する方法である。ミスマッチのある不安定なDNA断片が、ゲル中のある変性剤濃度の部分まで移動すると、ミスマッチ周辺のDNA配列はその不安定さのために、部分的に1本鎖へと解離する。この部分的に解離したDNA断片の移動度は、非常に遅くなり、解離部分のない完全な二本鎖DNAの移動度と差がつくことから、両者を分離することができる。具体的には、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域を含むDNAを本発明のプライマー等を用いたPCR法等によって増幅し、これを尿素などの変性剤の濃度が移動するに従って徐々に高くなっているポリアクリルアミドゲル中で電気泳動し、対照と比較する。変異が存在するDNA断片の場合、より低い変性剤濃度位置でDNA断片が一本鎖になり、極端に移動速度が遅くなるため、この移動度の差を検出することにより変異の有無を検出することができる。

【0061】

上記の方法以外にも、特定位置の変異のみを検出する目的にはアレル特異的オリゴヌクレオチド（Allele Specific Oligonucleotide／ASO）ハイブリダイゼーション法が利用できる。変異が存在すると考えられる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを作製し、これと試料DNAでハイブリダイゼーションを行わせると、変異が存在する場合、ハイブリッド形成の効率が低下する。それをサザンブロット法や、特殊な蛍光試薬がハイブリッドのギャップにインターカレーションすることにより消光する性質を利用した方法、等により検出することができる。また、リボヌクレアーゼAミスマッチ切断法による検出も可能である。具体的には、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNAをPCR法等によって増幅し、こ

れをプラスミドベクター等に組み込んだ対照cDNA等から調製した標識RNAとハイブリダイゼーションを行う。変異が存在する部分においてはハイブリッドが一本鎖構造となるので、この部分をリボヌクレアーゼAによって切断し、これをオートラジオグラフィー等で検出することによって変異の存在を検出することができる。

【0062】

本発明の検査方法の他の態様は、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を検出することを含む方法である。ここで「遺伝子の発現」には、転写および翻訳が含まれる。従って、「発現産物」には、mRNAおよびタンパク質が含まれる。

【0063】

本発明の好ましい態様においては、被検者における本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を検出することを特徴とする、心臓疾患の検査方法が提供される。

【0064】

本方法においては、まず被検者の細胞（例えば、心筋細胞）からRNA試料を調製し、該試料中の本発明のポリペプチドをコードするRNA量を測定する。そして、測定したRNA量を対照と比較する。

【0065】

このような方法としては、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするプローブを用いたノーザンブロッティング法、または本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするプライマーを用いたRT-PCR法等を例示することができる。

【0066】

また、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写レベルにおける検査においては、DNAアレイ（新遺伝子工学ハンドブック、村松正實・山本雅、羊土社、p280-284）を利用することもできる。具体的には、まず、被検者から調製したcDNA試料、および本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドプローブが固定された基板を提供する。基板に固

定されるポリヌクレオチドプローブは、複数種の本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを検出するために、複数種であってもよい。被検者からのcDNA試料の調製は、当業者に周知の方法で行うことができる。cDNA試料の調製の好ましい態様においては、まず被検者の細胞から全RNAの抽出を行う。細胞としては、例えば心筋細胞などが例示できる。全RNAの抽出は、例えば次のようにして行うことができる。純度の高い全RNAが調製できる方法であれば、既存の方法およびキット等を用いることが可能である。次いで、抽出した全RNAを鋳型として、逆転写酵素を用いてcDNAの合成を行い、cDNA試料を調製する。全RNAからのcDNAの合成は、当業者に周知の方法で実施することができる。調製したcDNA試料には、必要に応じて、検出のための標識を施す。標識物質としては、検出可能なものであれば特に制限はなく、例えば、蛍光物質、放射性元素等を挙げることができる。標識は、当業者によって一般的に行われる方法(L Luo et al., Gene expression profiles of laser-captured adjacent neuronal subtypes. Nat Med. 1999, 117-122)で実施することができる。

【0067】

ここでいう「対照」とは、通常、健常者の心筋細胞より調製したRNA試料における本発明のポリペプチドをコードするRNAの量を指す。

【0068】

上記方法において、対照と比較して、本発明のポリペプチドをコードするRNAの量が有意に変化していた場合、被検者は、該遺伝子の発現異常に関連するとされる心臓疾患を罹患している、または該疾患を発症する危険を有すると判定される。また、心臓疾患を既に罹患していることが判明している被検者においては、その原因が、上記ポリペプチドをコードするRNAの発現量の変化にあるものと判定される。

【0069】

また、本発明の検査方法は、被検者の細胞（例えば、心筋細胞）におけるタンパク質の発現量を測定することにより、下記の如く実施することができる。まず、被検者の細胞からタンパク質試料を調製する。次いで、該タンパク質試料に含まれる本発明のポリペプチドの量を測定する。次いで、測定された該ポリペプチ

ドの量を対照と比較する。

【0070】

このような方法としては、SDSポリアクリルアミド電気泳動法、並びに該タンパク質に結合する抗体を用いた、ウェスタンブロッティング法、ドットブロッティング法、免疫沈降法、酵素結合免疫測定法(ELISA)、および免疫蛍光法を例示することができる。

【0071】

上記の方法において、対照と比較して、本発明のポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質の発現量が有意に変化していた場合、被検者は、心臓疾患を今後発症する疑いがある（危険性が高い）、もしくは既に心臓疾患を罹患していると判定される。また、心臓疾患を既に罹患していることが判明している被検者においては、その原因が、上記記載のポリヌクレオチドの発現量の変化にあるものと判定される。

【0072】

【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

【0073】

〔実施例1〕 発現ベクター構築

哺乳動物発現ベクターであるpCMV-FLAG、pCMV-T7、およびpCMV-HAは、N末端FLAG-、T7-、およびHA-タグ化タンパク質をそれぞれ発現するように設計した（Takatsu, G., S. Kishida, A. Hiyama, K. Yamaguchi, H. Shibuya, K. Irie, J. Ninomiya-Tsuji, and K. Matsumoto. 2000. TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signaltransduction pathway. Mol. Cell. 5:649-658.）。

【0074】

アフアディンのDILドメイン（aa606～983）を発現している哺乳動物発現ベクターは、pCMV-T7を用いて構築した。

【0075】

マウスADIP (mADIP) およびラットADIP (rADIP) を発現している哺乳動物発現ベクターである、pCMV-HA-mADIP (aa1~615)、pCMV-HA-rADIP-C (aa159~613)、pCMV-HA-mADIP-C (aa339~615)、pCMV-Flag-mADIP-C (aa339~615)、およびpCMV-Flag-mADIP-M (aa152~436) は、pCMV-FLAGおよびpCMV-HAを用いて構築した。

【 0 0 7 6 】

α -アクチニン-1 (ヒト、BC015766; GenBank) を発現している哺乳動物発現ベクターであるpCMV-HA- α -アクチニン-1-C (aa406~892) は、pCMV-HAを用いて構築した。

【 0 0 7 7 】

mADIPおよびrADIPのグルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) 融合またはMBP-融合ベクターであるMBP-mADIP (aa1~615)、MBP-rADIP-C (aa159~613)、MBP-mADIP-C (aa339~615)、GST-rADIP-C (aa159~613)、GST-mADIP-N (aa1~226) およびGST-mADIP-C (aa339~615) は、pGEX-KG (Guan, K.L., and J.E. Dixon . 1991. Eukaryotic proteins expressed in Escherichia coli: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase. Anal. Biochem. 192:262-267.) およびpMal-C2 (New England Biolabs) を用いて構築した。

【 0 0 7 8 】

〔実施例 2〕 抗体の調製

rADIPのC末端部分 (aa159~613;rADIP)、mADIPのN末端部分 (aa1~226;mADIP-N) およびmADIPのC末端部分 (aa339~615;mADIP-C) の断片を持つ各GST融合タンパク質を、大腸菌内で作製・精製後、ウサギpAbを上昇させる各抗原として使用した。

【 0 0 7 9 】

rADIPおよびmADIP-Cに対する2種類のpAbであるM05およびM01はそれぞれ、MBP-rADIP-C (aa159~613) およびMBP-mADIP-C (aa339~615) とのアフィニティー精製後に使用した。mADIP-Nに対するpAbであるM57は、GST-mADIP-N (aa1~226) とのアフィニティー精製後に使用した。

【0080】

GST-およびMBP-融合タンパク質は、グルタチオン-セファロースビーズ (Amersham-Pharmacia Biotech) およびアミロースレジンビーズ (New England Biolabs) をそれぞれ使用して精製した。

【0081】

マウス抗アファディン mAbは、文献記載のように調製した (Sakisaka, T, H. Nakanishi, K. Takahashi, K. Mandai, M. Miyahara, A. Satoh, K. Takaishi, and Y. Takai. 1999. Different behavior of I-afadin and neurabin-II during the formation and destruction of cell-cell adherens junction. Oncogene. 18:1609-1617.)。

【0082】

ラット抗E-カドヘリンmAb (ECCD2) は、M. Takeichi博士 (Center for Developmental Biology, RIKEN, Kobe, Japan) から寄贈された。マウス抗ZO-1mAbはChemiconより購入した。マウス抗 α -アクチニン、抗ビンクリンおよび抗-Flag-M2 mAbはSigma Chemicalsより購入した。ウサギ抗 α -アクチンpAbはSanta Cruzより購入した。マウス抗T7 mAbはNovagenより購入した。

【0083】

〔実施例3〕 細胞の培養およびタンパク質濃度

HEK293、MDCK、ネクチン-2 α -Lおよびネクチン-2 α - Δ C-L細胞は、10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) 中で培養した。

【0084】

タンパク質濃度は、参照タンパク質としてウシ血清アルブミンを用いて決定した (Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254.)。

【0085】

〔実施例4〕 アファディン結合タンパク質の同定

アファディンに結合するタンパク質を同定するため、本発明者らは、DILドメイン (aa606~983) を含むアファディンの領域をベイト (bait) として使用して

、酵母ツーハイブリッドスクリーニングを実施した。アファディンの概略構造を図 1 A に示す。

【 0 0 8 6 】

ベイトベクターである pGBDU-アファディン (aa511~981) は、アファディンの aa 残基をコードする挿入断片を、pGBDU-C1 (James, P., J. Hallady, and E.A. Craig. 1996. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. Genetics. 144:1425-1436) にサブクローニングすることにより作製した。

【 0 0 8 7 】

11 日齢マウスの胚、ラット脳、ラット肺、およびヒト精巣 cDNA から構築した酵母ツーハイブリッドライブラリーを、クロンテックから購入した。

【 0 0 8 8 】

酵母株 PJ69-4A (MATa trp1-901 leu2-3, 112 ura3-52 his3-200 gal4 Δ gal80 Δ GAL2-ADE2 LYS2::GAL1-HIS3 met2::GAL7-lacZ) を使用したツーハイブリッドスクリーニングを文献記載 (James, P., J. Hallady, and E.A. Craig. 1996. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. Genetics. 144:1425-1436) のように実施した。酵母操作は、標準的な手順を用いて、文献記載 (Kaiser, C.A., A. Adams, and D.E. Gottschling. 1994. Methods in Yeast Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.) のように実施した。

【 0 0 8 9 】

結果、マウス胚ライブラリーの 2×10^5 個のクローン、および、ラット脳ライブラリーの 2×10^5 個のクローンをスクリーニングし、それぞれ 31 および 25 個の陽性クローンを得た。4 つのマウスクローンおよび 1 つのラットクローンが、ヒト KIAA 0923 のカルボキシル末端部分に類似したタンパク質をコードしていた (AB023140 ; GenBank/EMBL/DBJ)。ADIP は特異的にアファディンの DIL ドメインに結合したが、酵母 Myo4 の DIL ドメインには結合しなかったことが判明した (図 1 B)。なお、図示されたプラスミドを持つ酵母形質転換体は、HIS3 レポーター活性を評価するために、ヒスチジン欠失合成完全培地上に画線し、30℃ で 3 日間インキュ

ベートしたものである。

【0090】

本発明者らは、このタンパク質をADIP（アフアディン DILドメイン相互作用タンパク質）と命名した。ADIPは、3つのコイル状コイルドドメインを有し、第三のコイル状コイルドドメイン（aa339～480）を含む領域は、アフアディンのDILドメインの結合に必要であった（図2Aおよび図3A）。

【0091】

〔実施例5〕 マウスADIPおよびラットADIPの全長cDNA

マウスおよびラットのADIPの全長cDNAに関し、GenbankおよびEMBLデータベースに対しBLAST検索を実施した。GenbankおよびEMBL配列のヒトサブセットに対するBLAST検索により得たヒットのセレクションを使用して、KIAA0923のヒトホモログのcDNA配列をアセンブルした（AB023140；GenBank／EMBL／DDBJ）。KIAA0923のcDNAは、T. Nagase博士（かずさDNAリサーチ研究所）から提供された。

【0092】

mADIP（アクセッション番号：AF532969）およびrADIP（アクセッション番号：AF532970）の全長cDNAは、それぞれマウスおよびラット脳cDNA（Clontech）から、以下のプライマーセットを用いて、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により作製した；mADIP cDNAでは、5'-CGTAGGAGAGTGACAGGAGCTG-3'（配列番号：5）、5'-GGTTATCGAGTTTTTCTACATGAC-3'（配列番号：6）；rADIP cDNAでは、5'-CGTAGGAGAGTGACAGGAGCTG-3'（配列番号：7）、5'-TTCCTGTTTTTGCAGTGTAGCTG-3'（配列番号：8）。

【0093】

PCR産物は、pCR4B（Invitrogen）にサブクローニングし、ヌクレオチド配列解析を、ジデオキシヌクレオチド終結法により、DNAシーケンサー（モデル3100；Applied Biosystems, Inc.）を使用して実施した。

【0094】

マウスおよびラット全長cDNAは、それぞれ、計算分子量70,954の615aaおよび計算分子量70,684の613aaからなるタンパク質をコードしていた（図2A）。

マウスADIP（mADIP）およびラットADIP（rADIP）のaa配列は、互いに92%同一で

あり、それぞれヒトKIAA0923のaa配列に88%および87%同一であった（図2A）。

。

【0095】

〔実施例6〕 トランスフェクション

単離cDNAがADIPの全長をコードするかどうかを確認するために、HEK293細胞を、赤血球凝集素（HA）タグ化全長mADIPを発現する、pCMV-HA-mADIPでトランスフェクトした。トランスフェクションは、CalPhos mammalian transfectionキット（Clontech）を用いた。MDCKおよびHEK293細胞抽出物を、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）に付した。SDS-PAGEはLaemmli（Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 277:680-685）記載のように行った。その後、抗ADIPポリクローナル抗体（pAbs）である3つの抗ADIP pAb（M57、M01、およびM05）を用いたウエスタンブロットにかけた。

【0096】

その結果、HA-mADIPを発現しているHEK293細胞抽出物から、HAタグ化ADIPの分子量に類似した約78kDaの分子量を有するタンパク質が検出された（図2B）。

【0097】

したがって、本発明者らは、単離cDNAが、ADIPの全長をコードすると結論づけた。

【0098】

〔実施例7〕 ADIP機能同定— α -アクチニンへの結合

ADIPの機能に関する洞察を得るために、本発明者らは、ADIP結合タンパク質（群）の同定を試みた。上記したように、ADIPは、3つのコイル状コイルドメインを有し、ADIPの第三のコイル状コイルドメイン（aa339～480）を含む領域は、アフアディンのDILドメインに結合するのに必要である。

【0099】

本発明者らは、ベイトとして、全部で3つのコイル状コイルドメイン（aa152～436）を含むADIPの領域を使用して、酵母ツーハイブリッドスクリーニングを実施した。ベイトベクターであるpGBD-mADIP-B（aa152～436）は、mADIPのaa残基

をコードする挿入断片をpGBD-C1 (James, P., J. Hallady, and E.A. Craig. 1996. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*. 144:1425-1436) にサブクローニングすることにより構築した。

【 0 1 0 0 】

本発明者らは、ラット肺ライブラリーの 7×10^5 個のクローンをスクリーニングし、18個の陽性クローンを得た。9個のクローンが、 α -アクチニン-1 (ヒト、BC 015766 ; GenBank) のC末端部分をコードした。 α -アクチニンは、F-アクチン架橋活性を示す十分に特徴づけられたタンパク質である (Burridge, K., and J.R. Feramisco. 1981. Non-muscle alpha actinins are calcium-sensitive actin-binding proteins. *Nature*. 294:565-567.)。ヒト α -アクチニンの4つのアイソフォームが同定されている: 非筋肉アクチニン-1およびアクチニン-4、および筋肉アクチニン-2およびアクチニン-3 (Millake, D.B., A.D. Blanchard, B. Patel, and D.R. Critchley. 1989. The cDNA sequence of a human placental alpha-actinin. *Nucleic. Acids. Res.* 17:6725. ; Youssoufian, H., M. McAfee, and D.J. Kwiatkowski. 1990. Cloning and chromosomal localization of the human cytoskeletal alpha-actinin gene reveals linkage to the beta-spectrin gene. *Am. J. Hum. Genet* 47:62-71. ; Beggs, A.H., T.J. Byers, J.H. Knoll, F.M. Boyce, G.A. Bruns, and L.M. Kunkel. 1992. Cloning and characterization of two human skeletal muscle alpha-actinin genes located on chromosomes 1 and 11. *J. Biol. Chem.* 267:9281-9288. ; Honda, K., T. Yamada, R. Endo, Y. Ino, M. Gotoh, H. Tsuda, Y. Yamada, H. Chiba, and S. Hirohashi. 1998. Actinin-4, a novel actin-bundling protein associated with cell motility and cancer invasion. *J. Cell Biol.* 140:1383-1393.)。

【 0 1 0 1 】

本解析により推定したところ、ADIPは α -アクチニン-1に加えて α -アクチニン-2に結合した (データは示さず)。これは、ADIPの α -アクチニンへの結合は、 α -アクチニン-1に特異的ではないことを示すものである。また、ADIPの第一コイル状コイルドメイン (aa1~226) のみを含む領域が α -アクチニン-1に結合し

(図 3 A)、 α -アクチニン-1のC末端の2つのEFハンドモチーフが、ADIPへのその結合に必要であることが明らかになった(図 9 A)。

【0 1 0 2】

これらの結果により、ADIPの第一コイル状コイルドメインは、 α -アクチニン-1のEFハンドモチーフに結合することが示された。

【0 1 0 3】

〔実施例 8〕 免疫沈降およびアフィニティークロマトグラフィー

インビトロおよびインビボでのADIPのアファディンへの結合をさらに確認するために、本発明者らは、免疫沈降およびアフィニティークロマトグラフィー解析を実施した。

【0 1 0 4】

HEK293細胞を用いた共免疫沈降実験は、次のように行った；種々の組合わせの発現プラスミドを用いて、HEK293細胞にトランスフェクトした。細胞を緩衝液A 1ml (pH7.5の20mM Tris-HCl、150mM NaCl、1% Triton X-100、1mM EDTA、10 μ M α -フェニルメタンスルホニルフッ化塩酸塩、および10 μ g/ml アプロチニン) 中で懸濁し、10秒間隔で10秒間、3回超音波処理し、氷上で30分間インキュベートした。100,000 x gで15分間遠心分離し、細胞抽出物(タンパク質1.2mg)を得て、次にprotein G Sepharose 4 Fast Flowビーズ(Amersham-Pharmacia Biotechnology)を用いたインキュベーションにより予備洗浄した。細胞抽出物を、20 μ lの抗FLAG M2 mAbで被覆したprotein G Sepharose 4 Fast Flowビーズを用いて4℃で18時間インキュベートした。ビーズを緩衝液Aで洗浄後、ビーズをSDS試料緩衝液(pH6.7の60mM Tris-HCl、3% SDS、2% 2-メルカプトエタノール、5% グリセロール)中で10分間沸騰して、結合タンパク質を溶出させた。次に試料をSDS-PAGEにかけ、続いてウエスタンブロットを行った。

【0 1 0 5】

MDCK細胞を用いた共免疫沈降実験は以下のように行った：2個の10cm皿上のMDC K細胞を緩衝液A 2ml中で超音波処理し、続いて100,000 x gで15分間、超遠心分離処理を行った。細胞抽出物はprotein A Sepharose CL-4Bビーズ(Amersham-Pharmacia Biotechnology)を用いたインキュベーションにより、予備洗浄し、次

に20 μ lの抗ADIP pAb (M05) で被覆したprotein A Sepharose CL-4Bビーズを用いて4℃で18時間インキュベートした。ビーズを緩衝液Aで洗浄した後、ビーズをSDS試料緩衝液中で10分間沸騰して、結合タンパク質を溶出させた。次に試料をSDS-PAGEにかけ、続いてウエスタンブロットを行った。

【 0 1 0 6 】

MDCK細胞を用いたアフィニティークロマトグラフィーは以下のように行った：2枚の10cm皿上のMDCK細胞を、2mlの緩衝液中で超音波処理し、続いて100,000 x gで15分間、超遠心分離を行った。上清を、20 μ l (湿潤体積) のアミロース樹脂ビーズ (New England Biolabs) に固定化したMBPまたはMBP-mADIP (それぞれ200 pmol) によって4℃で18時間インキュベートした。ビーズを緩衝液Aによって広範囲に洗浄した後、結合タンパク質を20mMマルトースを含む緩衝液Aによって溶出した。溶出液はSDSサンプル緩衝液中で沸騰させた。次にサンプルをSDS-PAGEにかけ、次に抗アフアディン mAbによってウエスタンブロットを行った。

【 0 1 0 7 】

FLAGタグ化mADIP-Cを持つアフアディンのT7タグ化DILドメインの共免疫沈降を行った。発現ベクターは図 3 B 中に図示されているように、HEK293細胞内にトランスフェクトされた。アフアディンのT7タグ化DILドメインは、抗T7および抗Flag mAbを用いたウエスタンブロットによって示されるように、Flagタグ化mADIP-Cと特異的に共免疫沈降した。

【 0 1 0 8 】

次に、内因性アフアディンを発現しているMDCK細胞の抽出物を、アミロースレジンビーズ上に固定した全長mADIP (aa1~615) のマルトース結合タンパク質 (MBP) 融合タンパク質と共にインキュベートした。ビーズを溶解緩衝液で洗浄した後、結合したタンパク質を溶出し、溶出液をSDS-PAGEに、その後、抗アフアディン mAbを用いたウエスタンブロットにかけた。アフアディンは実際にMBP-mADIPに結合したが、MBP単独には結合しなかった (図 3 C) 。

【 0 1 0 9 】

最後に、ADIPがインビボでアフアディンに結合することを確認するために、本発明者らは、内因性アフアディンが、MDCK細胞の抽出物から、内因性ADIPと共免

疫沈降したかどうかを調べた。内因性ADIPを、抗ADIP pAbを用いて、MDCK細胞の抽出物から免疫沈降した場合、内因性アファディンが共免疫沈降した（図 3 D）。アファディンは、対照IgGと共免疫沈降しなかった。二重ハイブリッド解析及びこれらの結果により、ADIPは、インビトロおよびインビボでの両方でアファディンに結合することが示された。

【 0 1 1 0 】

〔実施例 1 0〕 ADIPの組織分布及び亜細胞分布

ノーザンブロッティングは、文献記載のように行った (Sambrook, J., E.F Fr itsch, and T Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 7 .1-7.87.)。mADIP cDNA断片 (bp552~3194) は、標準ランダムプライミング法によって [α 32 P] によって放射線標識し、マウス複数組織ノーザンブロット (Clontech) にプローブとして用いた。

【 0 1 1 1 】

結果、心臓、脳、脾臓、肺、肝臓、骨格筋、腎臓および精巣を含む全マウス組織に、~4. 3kbのmRNAが検出された（図 4 A）。また、より小さなバンド（~3 . 0kb）が、肝臓および精巣に検出された（図 4 A レーン5および8）。

【 0 1 1 2 】

また、種々のマウス組織のホモジネート（それぞれタンパク質30 μ g）をSDS-P AGE（10%ポリアクリルアミドゲル）にかけ、続いて抗ADIP pAbであるM57を使用したウエスタンブロット解析を行った。結果、~78kDaのタンパク質が検出された。これは、HEK293およびMDCK細胞、およびマウスの脾臓、肺、および腎臓で検出されたADIPと同じサイズであった（図 4 B レーン3、4、7および9）。より小さなバンド（心臓では~60kDa、精巣では~76kDaおよび~40kDa）も検出され、ADIPのより小さなスプライス変異体が発現され得ることが示唆された（図 4 B レーン1および8）。

【 0 1 1 3 】

ラット肝臓における亜細胞分画解析は、文献記載のように行った (Kawabe, H. , H. Nakanishi, M. Asada, A. Fukuhara, K. Morimoto, M. Takeuchi, and Y.T

akai. 2001. Pilt, a novel peripheral membrane protein at tight junctions in epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 276:48350-48355)。各画分（それぞれタンパク質30 μ g）をSDS-PAGE（10%ポリアクリルアミドゲル）にかけ、続いて抗ADIP pAbであるM57または抗アフアディン mAbを用いてウエスタンブロットを行った。結果、ADIPはAJsおよびTJsの豊富な画分に豊富で、且つここではアフアディンも豊富であった（図4 C レーン4および5）。ADIPの組織分布をウエスタンブロット解析した際に、肝臓で \sim 78kDaのタンパク質を検出できなかった理由は、おそらく、発現レベルが低いためと考えられる（図4 B レーン5）。

【0114】

これらの結果から、ADIPの発現レベルは組織に応じて変化すが、広範に発現されていることが示された。

【0115】

〔実施例11〕 上皮細胞のAJsにおけるアフアディンとADIPの共局在化

アフアディンは、F-アクチン束の裏打ちされたAJsに厳密に局在していることが示されている（Mandaiら、1997）。そこで、本発明者らは、ADIPが、MDCK細胞のAJsにおいてアフアディンと共局在しているかどうかを、免疫蛍光顕微鏡により調べた。

【0116】

マウス組織の培養細胞および凍結切片の免疫蛍光顕微鏡法は、文献記載のように行った（Mandai, K., H. Nakanishi, A. Satoh, H. Obaishi, M. Wada, H. Nishioka, M. Itoh, A. Mizoguchi, T. Aoki, T. Fujimoto, Y. Matsuda, S. Tsukita, and Y. Takai. 1997. Afadin: A novel actin filament-binding protein with one PDZ domain localized at cadherin-based cell-to-cell adherens junction. *J. Cell Biol.* 139:517-528. ; Takahashi, K., H. Nakanishi, M. Miyahara, K. Mandai, K. Satoh, A. Satoh, H. Nishioka, J. Aoki, A. Nomoto, A. Mizoguchi, and Y. Takai. 1999. Nectin/PRR: an immunoglobulin-like cell adhesion molecule recruited to cadherin-based adherens junctions through interaction with Afadin, a PDZ domain-containing protein. *J. Cell Biol.* 145:539-549.)。詳しくは、MDCK細胞を、抗ADIP(MO5)、抗アフアディン、抗ビ

ンクリンAbsの種々の組み合わせによって二重染色した。

【0117】

結果、ADIPおよびアフアディンは、細胞-細胞接合部に共局在した（図5A）。本質的に同様の結果が、3つの抗ADIP pAbであるM57、M01、およびM05で得られた。

【0118】

さらに、ADIPについて、ゴルジ複合体のマーカーであるゴルジ58kタンパク質で同時染色した。結果、核周囲領域で、ゴルジ複合体において染色された（図5A）。

【0119】

〔実施例12〕 ADIPと内因性アフアディンの局在の比較

ADIPとアフアディンの共局在を確認するために、HAタグ化ADIP（rADIP-C；aa159～613）を、安定して発現するネクチン-2 α -Lおよびネクチン-2 α - Δ C-L細胞を、LIPOFECTAMINE 2000（Invitrogen）を用いて調製した。

【0120】

全長ネクチン-2 α （ネクチン-2 α -L細胞）またはC末端の4つのaaが欠失したネクチン-2 α （ネクチン-2 α - Δ C-L細胞）を安定して発現しているカドヘリン欠損L細胞で一過的に発現させ、発現タンパク質の局在を、内因性アフアディンの局在と比較した。全長ネクチン-2 α は、アフアディンに結合できるが、ネクチン-2 α - Δ Cは結合できない（Takahashi, K., H. Nakanishi, M. Miyahara, K. Manda i, K. Satoh, A. Satoh, H. Nishioka, J. Aoki, A. Nomoto, A. Mizoguchi, and Y. Takai. 1999. Nectin/PRR: an immunoglobulin-like cell adhesion molecule recruited to cadherin-based adherens junctions through interaction with Afadin, a PDZ domain-containing protein. J. Cell Biol. 145:539-549.）。

【0121】

結果、アフアディンは、文献記載のように（Miyahara, M., H. Nakanishi, K. Takahashi, K. Satoh-Horikawa, K. Tachibana, and Y. Takai. 2000. Interaction of nectin with afadin is necessary for its clustering at cell-cell

nteraction. J.
Mandai, K. Oza
Y. Takai. 2000.
ct through thei
50:1161-1176.)
細胞接着部位に
とした細胞-細胞
存在を示した (図

、細胞-細胞接着

ス小腸の凍結切片
重に染色した。小
よく分離していた
1-Yasuda, S. Tsu
ing with cadheri
junction-associ
oelectron micros
ーカーであること
oseker, and D.A.
ar weight polype
ns) in a variety
Nagafuchi, S. Yo
3. The 220-kD pr
s is identical t
l cells: cDNA cl

oning and immunoelectron microscopy. J Cell Biol. 121:491-502.)。

【0124】

極薄凍結切片手法を用いたマウス小腸吸収上皮細胞の免疫電子顕微鏡法は、文献記載のように行った (Mandai, K., H. Nakanishi, A. Satoh, H. Obaishi, M. Wada, H. Nishioka, M. Itoh, A. Mizoguchi, T. Aoki, T. Fujimoto, Y. Matsuda, S. Tsukita, and Y. Takai. 1997. Afadin: A novel actin filament-binding protein with one PDZ domain localized at cadherin-based cell-to-cell adherens junction. J. Cell Biol. 139:517-528.)。

【0125】

結果、ADIPはアフアディンと共局在を示したが、吸収上皮においては、ZO-1よりも僅かに基底側に局在していた (図7Aおよび7Bの矢印)。

【0126】

また、ADIPは、F-アクチン束に裏打ちされたAJsに専ら局在し、TJsおよびデスマソームには存在しないことが判明した (図7C)。ADIPのこの局在パターンは、アフアディンおよびネクチンのものと同じであった。しかし、AJsに集中しているが、側方形質膜の先端から基底側までより広範に分布を示す、E-カドヘリンの局在パターンとは異なっていた (Mandai, K., H. Nakanishi, A. Satoh, H. Obaishi, M. Wada, H. Nishioka, M. Itoh, A. Mizoguchi, T. Aoki, T. Fujimoto, Y. Matsuda, S. Tsukita, and Y. Takai. 1997. Afadin: A novel actin filament-binding protein with one PDZ domain localized at cadherin-based cell-to-cell adherens junction. J. Cell Biol. 139:517-528.; Takahashi, K., H. Nakanishi, M. Miyahara, K. Mandai, K. Satoh, A. Satoh, H. Nishioka, J. Aoki, A. Nomoto, A. Mizoguchi, and Y. Takai. 1999. Nectin/PRR: an immunoglobulin-like cell adhesion molecule recruited to cadherin-based adherens junctions through interaction with Afadin, a PDZ domain-containing protein. J. Cell Biol. 145:539-549.)。

【0127】

これらの結果から、ADIPは、F-アクチン束に裏打ちされた細胞-細胞AJsにおいて、アフアディンおよびネクチンと共局在することが示された。

【 0 1 2 8 】

〔実施例 1 4〕 ADIPシグナル

ADIPシグナルは、MDCK細胞においてビンクリンシグナルが検出された、限局的接着部位には検出されなかった（図 5 B）。

【 0 1 2 9 】

心臓では、コスタメアと呼ばれる、限局的接着部位が十分に発達し、心筋細胞の側方境界に沿って周期的に位置していた（Terracio, L., D.G. Simpson, L. Hilenski, W. Carver, R.S. Decker, N. Vinson, and T.K. Borg. 1990. Distribution of vinculin in the Z-disk of striated muscle: analysis by laser scanning confocal microscopy. J. Cell Physiol. 145:78-87.）。ビンクリンはコスタメアに局在し、一方、ネクチンおよびアフアディンはそうではないことが分かっている（Mandai, K., H. Nakanishi, A. Satoh, H. Obaishi, M. Wada, H. Nishioka, M. Itoh, A. Mizoguchi, T. Aoki, T. Fujimoto, Y. Matsuda, S. Tsukita, and Y. Takai. 1997. Afadin: A novel actin filament-binding protein with one PDZ domain localized at cadherin-based cell-to-cell adherens junction. J. Cell Biol. 139:517-528.; Takahashi, K., H. Nakanishi, M. Miyahara, K. Mandai, K. Satoh, A. Satoh, H. Nishioka, J. Aoki, A. Nomoto, A. Mizoguchi, and Y. Takai. 1999. Nectin/PRR: an immunoglobulin-like cell adhesion molecule recruited to cadherin-based adherens junctions through interaction with Afadin, a PDZ domain-containing protein. J. Cell Biol. 145:539-549.）。

【 0 1 3 0 】

ADIPシグナルは、ビンクリンシグナルが検出されたコスタメアには検出されなかった（図 7 Dの矢印）。

【 0 1 3 1 】

ADIPおよびビンクリンシグナルの両方が、細胞-細胞AJsに対応する、介在板（intercalated disc）で検出された（図 7 Dのくさび）。

【 0 1 3 2 】

これらの結果より、ADIPは細胞-マトリックス接合部には局在しないことが示

された。

【0133】

〔実施例 15〕 Ca^{2+} スイッチアッセイ

次に、本発明者らは、MDCK細胞におけるAJsの破壊および形成中のアフアディンの局在と比較した、ADIPの局在を調べた。

【0134】

MDCK細胞を用いる Ca^{2+} スイッチ実験は、文献記載のように行った (Kartenbeck, J., M. Schmelz, W.W. Franke, and B. Geiger. 1991. Endocytosis of junctional cadherins in bovine kidney epithelial (MDBK) cells cultured in low Ca^{2+} ion medium. J. Cell Biol. 113:881-892.)。簡潔には、MDCK細胞 (1×10^5) を、12ウェル培養皿内の18mmガラスカバースリップに播種した。48時間後、細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄し、血清を含まないDMEM中で2mM Ca^{2+} にて60分間培養した。次に細胞を2 μM Ca^{2+} (5mM EGTAを含むDMEM) にて120分間培養した。培養後、細胞をPBSで洗浄し、再度血清を含まないDMEM中で2mM Ca^{2+} にて60分間培養した。細胞をホルボールエステル、すなわち12-O-テトラデカノイル-ホルボール-13-アセテート (TPA) で処理した場合、細胞をPBSで洗浄して、血清を含まないDMEM中で2mM Ca^{2+} にて60分間培養した。次に細胞を、5mM EGTAを含む2 μM Ca^{2+} で120分間培養した。培養後、100nM TPAを培地に加え、細胞をさらに60分間培養した。

【0135】

結果、培養培地中の Ca^{2+} 濃度を、2mMから2 μM に切り替えた場合、MDCK細胞は、文献記載のよう (Kartenbeck, J., M. Schmelz, W.W. Franke, and B. Geiger. 1991. Endocytosis of junctional cadherins in bovine kidney epithelial (MDBK) cells cultured in low Ca^{2+} ion medium. J. Cell Biol. 113:881-892.)、徐々に互いから脱着した。アフアディン、E-カドヘリンおよびADIPシグナルは、2mMの Ca^{2+} で培養した細胞の細胞-細胞接着部位に高度に集中していた (図8A)。これらの細胞を2 μM の Ca^{2+} で120分間培養した場合、E-カドヘリンシグナルは消失し、細胞内小胞上に一部出現した (図8BのE-カドヘリン)。アフアディンシグナルはほとんど、形質膜の遊離表面上に留まり、文献記載のように

(Sakisaka, T, H. Nakanishi, K. Takahashi, K. Mandai, M. Miyahara, A. Sato, K. Takaishi, and Y. Takai. 1999. Different behavior of 1-afadin and neurabin-II during the formation and destruction of cell-cell adherens junction. *Oncogene*. 18:1609-1617. ; Fukuhara, A., K. Irie, H. Nakanishi, K. Takekuni, T Kawakatsu, W. Ikeda, A. Yamada, T. Katata, T. Honda, T. Sato, K. Shimizu, H. Ozaki, H. Horiuchi, T. Kita, and Y. Takai. 2002. Involvement of Nectin in the Localization of Junctional Adhesion Molecule at Tight Junctions *Oncogene*. In press.)、環様構造を形成した(図 8 B のアフアデイン)。これらの条件下で、ADIP シグナルはほとんど、形質膜の遊離表面から消失した(図 8 B の ADIP)。

【 0 1 3 6 】

次に、 $2\mu\text{M}$ の Ca^{2+} で 120 分間予め培養した MDCK 細胞を、 2mM の Ca^{2+} で 60 分間再度培養し、細胞-細胞接着部位での ADIP の蓄積について、E-カドヘリンの蓄積と比較して調べた。 2mM の Ca^{2+} でインキュベート後、E-カドヘリンシグナルは、アフアデインが局在する細胞-細胞接着部位に再度集中した(図 8 C の E-カドヘリン)。ADIP シグナルもまた、細胞-細胞接着部位において再度集中した(図 8 C の ADIP)。

【 0 1 3 7 】

本発明者らは次に、 $2\mu\text{M}$ の Ca^{2+} で 120 分間予め培養した MDCK 細胞を、 $2\mu\text{M}$ の Ca^{2+} で、TPA と共に 60 分間インキュベートした場合、TJ 様構造が形成され、アフアデインおよび ZO-1 はそこに蓄積するが、E-カドヘリンは蓄積しないことが示された (Balda, M.S., L. Gonzalez-Mariscal, K. Matter, M. Cereijido, and J.M. Anderson. 1993. Assembly of the tight junction: the role of diacylglycerol. *J. Cell Biol.* 123:293-302. ; Asakura, T, H. Nakanishi, T Sakisaka, K. Takahashi, K. Mandai, M. Nishimura, T. Sasaki, and Y. Takai. 1999. Similar and differential behaviour between the nectin-afadin-ponsin and cadherin-catenin systems during the formation and disruption of the polarized junctional alignment in epithelial cells. *Genes Cells*. 4:573-581. ; Fukuhara, A., K. Irie, H. Nakanishi, K. Takekuni, T Kawakatsu, W. Ikeda, A.

Yamada, T. Katata, T. Honda, T. Sato, K. Shimizu, H. Ozaki, H. Horiuchi, T. Kita, and Y. Takai. 2002. Involvement of Nectin in the Localization of Junctional Adhesion Molecule at Tight Junctions Oncogene. In press. ; Fukuhara, A., K. Irie, A. Yamada, T. Katata, T. Honda, K. Shimizu, H. Nakanishi, and Y. Takai. 2002. Role of Nectin in Organization of Tight Junctions in Epithelial Cells. Genes Cells. In press.)。また、アフアディンシグナルはTPA誘導TJ様構造に局在したが、ADIPまたはE-カドヘリンシグナルは局在しなかった(図8D)。

【0138】

これらの結果により、ADIPは、接合部複合体の破壊および形成中のアフアディンの局在挙動とは異なる局在挙動を示すことが示された。

【0139】

〔実施例16〕 ADIPの α -アクチニン-1へのインビトロおよびインビボでの結合

ADIPの α -アクチニン-1へのインビトロおよびインビボでの結合を確認するために、本発明者らは、免疫沈降解析を実施した。

【0140】

HEK293細胞を、 α -アクチニン-1のHAタグ化C末端部分(HA- α -アクチニン-1-C; aa406~892) およびFLAGタグ化ADIP (FLAG-mADIP-M; aa152~436) を用いて同時トランスフェクトした。

【0141】

FLAGタグ化ADIPを、抗FLAG mAbを用いて細胞抽出物から免疫沈降した場合、HA- α -アクチニン-1-Cは、HA mAbを使用してウェスタンブロットにより検出したところ、共免疫沈降した(図9B)。

【0142】

FLAG-mADIP-Mを、抗FLAG Abを用いて、FLAGタグ化mADIP (FLAG-mADIP-M; aa152~436) のみを一過的に発現しているHEK293細胞の抽出物から免疫沈降した場合、内因性 α -アクチニンが共免疫沈降した(図9C)。

【0143】

最後に、内因性ADIPを、MDCK細胞の抽出物から、抗ADIP pAbを用いて免疫沈降した場合、内因性 α -アクチニンが共免疫沈降した（図9 D）。 α -アクチニンは、対照IgGでは共免疫沈降しなかった。

【0 1 4 4】

これらの結果より、ADIPは、インビトロおよびインビボの両方で α -アクチニンに結合することが示された。

【0 1 4 5】

〔実施例 1 7〕 MDCK細胞のAJsにおける α -アクチニンとADIPの共局在化

α -アクチニンは、 α -カテニンと相互作用し、AJsに局在することが示されているので（Knudsen, K.A., A.P. Soler, K.R. Johnson, and M.J. Wheelock. 1995. Interaction of alpha-actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via alpha-catenin. J. Cell Biol. 130:67-77.）、本発明者らは、免疫蛍光顕微鏡により、ADIPがMDCK細胞のAJsにおいて α -アクチニンと共局在するかどうかを調べた。

【0 1 4 6】

結果、ADIPおよび α -アクチニンは、細胞-細胞接合部で共局在した（図1 0 A）。 α -アクチニンはさらに、限局的接着部位に局在し、一方、ADIPはそうではなかった（データは示さず）。

【0 1 4 7】

接合部複合体領域におけるADIPおよび α -アクチニンの共局在をさらに確認するために、マウス小腸の凍結切片を、抗ADIP pAbおよび抗 α -アクチニンmAbで二重染色した。

【0 1 4 8】

結果、吸収上皮において、ADIPは α -アクチニンと共局在した（図1 0 B）。ADIPの局在は、上記したようにAJsに厳密に限定され、一方、 α -アクチニンの局在は、側方形質膜の先端から基底側までより広範に分布していた（図1 0 B）。

【0 1 4 9】

これらの結果により、ADIPは、F-アクチン束で裏打ちされた細胞-細胞AJsにおいて、アフアディンおよび α -アクチニンと複合体を形成することが示される。

【0150】

【発明の効果】

本発明者らにより、新規なアファディン DILドメイン結合性タンパク質(ADIP)、および該タンパク質をコードする遺伝子が提供された。本発明のタンパク質は、アクチン骨格を制御する薬剤を評価する際に有用であると考えられる。

【0151】

また、本発明のタンパク質は心筋細胞の介在板において非常に強い発現を示すことから、心筋梗塞や心筋炎等の心臓疾患における介在板の機能マーカーとして有効である。本発明の遺伝子の発現量を指標とすることにより、心臓疾患の診断を行うことが可能である。また、本発明のタンパク質は、心臓疾患を治療するための薬剤の候補化合物のスクリーニングに有用である。

【0152】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Eisai Co., Ltd.

<120> ADIP protein, and use thereof

<130> E1-X0202

<160> 8

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 2692

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (80)..(1927)

<223> /note="afadin-and alpha-actinin-binding protein"

<400> 1

cgtaggagag tgacaggagc tgttgtaagc gtcgcagcac tgagccgcct cctcaggtat 60

cctggctctg gaacttgct atg gga gat tgg atg act gtg aca gat cca gtt 112

Met Gly Asp Trp Met Thr Val Thr Asp Pro Val

1

5

10

ctg tgt aca gaa aac aaa aat ctc tct caa tat acc tca gaa aca aag 160

Leu Cys Thr Glu Asn Lys Asn Leu Ser Gln Tyr Thr Ser Glu Thr Lys

15

20

25

atg tct ccg tcc agt ttg tac tcc cag caa gtt ctg tgc tct tca gta 208

Met Ser Pro Ser Ser Leu Tyr Ser Gln Gln Val Leu Cys Ser Ser Val

30

35

40

cct tta tcc aaa aac gtg cat ggt gtt ttc ggt gtc ttc tgc aca gga 256

Pro Leu Ser Lys Asn Val His Gly Val Phe Gly Val Phe Cys Thr Gly

45

50

55

gag aac att gaa caa agt att tcc tat ctt gat cag gag ctg acc acc 304

Glu Asn Ile Glu Gln Ser Ile Ser Tyr Leu Asp Gln Glu Leu Thr Thr

60

65

70

75

ttc ggg ttt cct tcc ttg tat gaa gaa tcc aaa agt aaa gag gca aag 352
Phe Gly Phe Pro Ser Leu Tyr Glu Glu Ser Lys Ser Lys Glu Ala Lys
80 85 90

aga gaa tta aat ata gtc gct gtt ctg aac tgt atg aac gag ctg ctc 400
Arg Glu Leu Asn Ile Val Ala Val Leu Asn Cys Met Asn Glu Leu Leu
95 100 105

gtg ctt cag cgg aag aac ctg ctg gcc cag gag agc gtg gag aca cag 448
Val Leu Gln Arg Lys Asn Leu Leu Ala Gln Glu Ser Val Glu Thr Gln
110 115 120

aac ttg aag ctg ggc agt gac atg gac cac ctg cag agc tgc tac gcc 496
Asn Leu Lys Leu Gly Ser Asp Met Asp His Leu Gln Ser Cys Tyr Ala
125 130 135

aaa ctt aag gag cag ttg gaa acg tcc agg cgg gag atg atc ggg ctt 544
Lys Leu Lys Glu Gln Leu Glu Thr Ser Arg Arg Glu Met Ile Gly Leu
140 145 150 155

caa gag aga gac agg cag ctg cag tgc aag aac agg agt ttg cat cag 592
Gln Glu Arg Asp Arg Gln Leu Gln Cys Lys Asn Arg Ser Leu His Gln
160 165 170

ctc ctg aag aat gag aaa gat gag gta caa aaa tta caa aat atc ata 640
Leu Leu Lys Asn Glu Lys Asp Glu Val Gln Lys Leu Gln Asn Ile Ile
175 180 185

gcc agc cgg gct act cag tat aat cat gat gtg aag agg aag gag cgt 688

Ala Ser Arg Ala Thr Gln Tyr Asn His Asp Val Lys Arg Lys Glu Arg
 190 195 200

gaa tat aat aag cta aag gag cgc ctg cat cag ctc gtt atg aac aag 736
 Glu Tyr Asn Lys Leu Lys Glu Arg Leu His Gln Leu Val Met Asn Lys
 205 210 215

aag gat aaa aac ata gcc atg gat gtt tta aat tat gtg ggt cga gct 784
 Lys Asp Lys Asn Ile Ala Met Asp Val Leu Asn Tyr Val Gly Arg Ala
 220 225 230 235

gat ggc aaa cga ggc tca tgg agg act gac aaa aca gaa gcc agg aat 832
 Asp Gly Lys Arg Gly Ser Trp Arg Thr Asp Lys Thr Glu Ala Arg Asn
 240 245 250

gaa gat gag atg tac aaa att ctg ttg aat gat tat gag tac cgc cag 880
 Glu Asp Glu Met Tyr Lys Ile Leu Leu Asn Asp Tyr Glu Tyr Arg Gln
 255 260 265

aag cag atc ctg atg gag aac gcg gag ctg aag aag gtc ctc cag cag 928
 Lys Gln Ile Leu Met Glu Asn Ala Glu Leu Lys Lys Val Leu Gln Gln
 270 275 280

atg aag aag gag atg atc tct ctc ctg tct cct cag aag aag aag ccc 976
 Met Lys Lys Glu Met Ile Ser Leu Leu Ser Pro Gln Lys Lys Lys Pro
 285 290 295

agg gaa aga gca gag gac ggc aca ggc act gtt gct atc tcc gat ata 1024
 Arg Glu Arg Ala Glu Asp Gly Thr Gly Thr Val Ala Ile Ser Asp Ile

300	305	310	315	
gaa gat gac tct ggg gaa ctg agc aga gac agc gtg tgg ggc ctt tcc				1072
Glu Asp Asp Ser Gly Glu Leu Ser Arg Asp Ser Val Trp Gly Leu Ser				
	320	325	330	
tgt gac act gtg aga gag cag ctg aca aac agc atc agg aaa cag tgg				1120
Cys Asp Thr Val Arg Glu Gln Leu Thr Asn Ser Ile Arg Lys Gln Trp				
	335	340	345	
aga att ttg aaa agt cat gta gaa aaa ctc gat aac caa gct tcg aag				1168
Arg Ile Leu Lys Ser His Val Glu Lys Leu Asp Asn Gln Ala Ser Lys				
	350	355	360	
gta cac tca gag ggc ctt aat gag gag gac gtc atc tca cga caa gac				1216
Val His Ser Glu Gly Leu Asn Glu Glu Asp Val Ile Ser Arg Gln Asp				
	365	370	375	
cat gag caa gag act gag aaa ctg gag ctg gag att gag cgg tgt aaa				1264
His Glu Gln Glu Thr Glu Lys Leu Glu Leu Glu Ile Glu Arg Cys Lys				
380	385	390	395	
gag atg atc aag gct cag cag cag ctc tta cag cag cag ctg gcc acc				1312
Glu Met Ile Lys Ala Gln Gln Gln Leu Leu Gln Gln Gln Leu Ala Thr				
	400	405	410	
acg tgt gat gat gac acc acc tca ctg ttg cga gac tgt tac ttg ctg				1360
Thr Cys Asp Asp Asp Thr Thr Ser Leu Leu Arg Asp Cys Tyr Leu Leu				
	415	420	425	

gaa gaa aag gaa cgc ctt aaa gaa gag tgg acc ctt ttt aaa gag caa 1408
Glu Glu Lys Glu Arg Leu Lys Glu Glu Trp Thr Leu Phe Lys Glu Gln

430

435

440

aaa aag aat ttt gag aga gaa agg cga agc ttt aca gaa gct gcc att 1456
Lys Lys Asn Phe Glu Arg Glu Arg Arg Ser Phe Thr Glu Ala Ala Ile

445

450

455

cga ttg ggg ttg gag aga aag gcg ttt gaa gaa gag cga gcc agc tgg 1504
Arg Leu Gly Leu Glu Arg Lys Ala Phe Glu Glu Glu Arg Ala Ser Trp

460

465

470

475

gta aag cag cag ttt tta aac atg acg aac ttt gac cac cag aac tca 1552
Val Lys Gln Gln Phe Leu Asn Met Thr Asn Phe Asp His Gln Asn Ser

480

485

490

gaa aat gtg aaa ctt ttc agt gcc ttc tca gga agt tct gat cca gac 1600
Glu Asn Val Lys Leu Phe Ser Ala Phe Ser Gly Ser Ser Asp Pro Asp

495

500

505

aat ctt ata gtc cac tca cgg cca cgg caa aag aag cta cac agt gtg 1648
Asn Leu Ile Val His Ser Arg Pro Arg Gln Lys Lys Leu His Ser Val

510

515

520

gct aat ggg gtg cca gct tgc aca tca aaa ctg act aaa tct ctt cct 1696
Ala Asn Gly Val Pro Ala Cys Thr Ser Lys Leu Thr Lys Ser Leu Pro

525

530

535

gcc tca cct tct act tca gac ttt cgc cag aca cat tca tgt gtg tct 1744
Ala Ser Pro Ser Thr Ser Asp Phe Arg Gln Thr His Ser Cys Val Ser
540 545 550 555

gaa cac agt tcc atc agt gtg ctg aat ata act cct gaa gaa agt aaa 1792
Glu His Ser Ser Ile Ser Val Leu Asn Ile Thr Pro Glu Glu Ser Lys
560 565 570

cca agt gag gtt gca aga gaa agc acg gat cag aag tgg agc gtg cag 1840
Pro Ser Glu Val Ala Arg Glu Ser Thr Asp Gln Lys Trp Ser Val Gln
575 580 585

tcg agg ccc agc tcg cgg gag ggg tgc tac agc gga tgc tcc tcg gcc 1888
Ser Arg Pro Ser Ser Arg Glu Gly Cys Tyr Ser Gly Cys Ser Ser Ala
590 595 600

ttc agg agc gct cac ggg gac cga gat gac tta cct taa atgtgcgggc 1937
Phe Arg Ser Ala His Gly Asp Arg Asp Asp Leu Pro
605 610 615

tgcagtgtctg ttcccagatg tgcgctagag gagttgacac aggggtgtagc ataaagtcag 1997

tcgtctaact taagatgctc agagttgttt gtttgactt cgctgtcttc ccccaaagag 2057

ctgaaatgct aagctactta aaaggatgca aagctttggt tgtgtgttag taacagaagc 2117

ccctggctct gtgactgcag gaatgcatgg cgtttgatg gaaacagaag cgctggaatg 2177

attgcctcgc caggtaccga gaagagcact tttagggact ggcttctgta aacattaaat 2237

attcgcccc agtgtggttg gcattggaag ttagccttt acttgaatgt atactgtaga 2297
 tttttaacaa agcaggttct atatttatta tgtttagtgt gattttggga ttacctcttt 2357
 catatgtttt gtgtctgtac ataaatatac atgactatgt taagaggctt taaggtttaa 2417
 aaacttcaca ccatgcttga gtatagcatt tcatgccaat taaaatgttt tcagtggcat 2477
 ggtgtttaca gaggttagga ccactgccac atgacagtta agactttatt ttttaagccat 2537
 ctgggcaata aaaattcaaa gcccttcat aagctgagtt cagataacta gaactactaa 2597
 cgttacatit ttgagatttt taaagcattg tatittatit tatatatgtg aatgttataa 2657
 tttctaagag gaatattgat tatggagtaa tgggg 2692

<210> 2

<211> 615

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met Gly Asp Trp Met Thr Val Thr Asp Pro Val Leu Cys Thr Glu Asn

1 5 10 15

Lys Asn Leu Ser Gln Tyr Thr Ser Glu Thr Lys Met Ser Pro Ser Ser

20 25 30

Leu Tyr Ser Gln Gln Val Leu Cys Ser Ser Val Pro Leu Ser Lys Asn
35 40 45

Val His Gly Val Phe Gly Val Phe Cys Thr Gly Glu Asn Ile Glu Gln
50 55 60

Ser Ile Ser Tyr Leu Asp Gln Glu Leu Thr Thr Phe Gly Phe Pro Ser
65 70 75 80

Leu Tyr Glu Glu Ser Lys Ser Lys Glu Ala Lys Arg Glu Leu Asn Ile
85 90 95

Val Ala Val Leu Asn Cys Met Asn Glu Leu Leu Val Leu Gln Arg Lys
100 105 110

Asn Leu Leu Ala Gln Glu Ser Val Glu Thr Gln Asn Leu Lys Leu Gly
115 120 125

Ser Asp Met Asp His Leu Gln Ser Cys Tyr Ala Lys Leu Lys Glu Gln
130 135 140

Leu Glu Thr Ser Arg Arg Glu Met Ile Gly Leu Gln Glu Arg Asp Arg
145 150 155 160

Gln Leu Gln Cys Lys Asn Arg Ser Leu His Gln Leu Leu Lys Asn Glu
165 170 175

Lys Asp Glu Val Gln Lys Leu Gln Asn Ile Ile Ala Ser Arg Ala Thr

180	185	190
Gln Tyr Asn His Asp Val Lys Arg Lys Glu Arg Glu Tyr Asn Lys Leu		
195	200	205
Lys Glu Arg Leu His Gln Leu Val Met Asn Lys Lys Asp Lys Asn Ile		
210	215	220
Ala Met Asp Val Leu Asn Tyr Val Gly Arg Ala Asp Gly Lys Arg Gly		
225	230	235
240		
Ser Trp Arg Thr Asp Lys Thr Glu Ala Arg Asn Glu Asp Glu Met Tyr		
245	250	255
Lys Ile Leu Leu Asn Asp Tyr Glu Tyr Arg Gln Lys Gln Ile Leu Met		
260	265	270
Glu Asn Ala Glu Leu Lys Lys Val Leu Gln Gln Met Lys Lys Glu Met		
275	280	285
Ile Ser Leu Leu Ser Pro Gln Lys Lys Lys Pro Arg Glu Arg Ala Glu		
290	295	300
Asp Gly Thr Gly Thr Val Ala Ile Ser Asp Ile Glu Asp Asp Ser Gly		
305	310	315
320		
Glu Leu Ser Arg Asp Ser Val Trp Gly Leu Ser Cys Asp Thr Val Arg		
325	330	335

Glu Gln Leu Thr Asn Ser Ile Arg Lys Gln Trp Arg Ile Leu Lys Ser
340 345 350

His Val Glu Lys Leu Asp Asn Gln Ala Ser Lys Val His Ser Glu Gly
355 360 365

Leu Asn Glu Glu Asp Val Ile Ser Arg Gln Asp His Glu Gln Glu Thr
370 375 380

Glu Lys Leu Glu Leu Glu Ile Glu Arg Cys Lys Glu Met Ile Lys Ala
385 390 395 400

Gln Gln Gln Leu Leu Gln Gln Gln Leu Ala Thr Thr Cys Asp Asp Asp
405 410 415

Thr Thr Ser Leu Leu Arg Asp Cys Tyr Leu Leu Glu Glu Lys Glu Arg
420 425 430

Leu Lys Glu Glu Trp Thr Leu Phe Lys Glu Gln Lys Lys Asn Phe Glu
435 440 445

Arg Glu Arg Arg Ser Phe Thr Glu Ala Ala Ile Arg Leu Gly Leu Glu
450 455 460

Arg Lys Ala Phe Glu Glu Glu Arg Ala Ser Trp Val Lys Gln Gln Phe
465 470 475 480

Leu Asn Met Thr Asn Phe Asp His Gln Asn Ser Glu Asn Val Lys Leu
485 490 495

Phe Ser Ala Phe Ser Gly Ser Ser Asp Pro Asp Asn Leu Ile Val His
500 505 510

Ser Arg Pro Arg Gln Lys Lys Leu His Ser Val Ala Asn Gly Val Pro
515 520 525

Ala Cys Thr Ser Lys Leu Thr Lys Ser Leu Pro Ala Ser Pro Ser Thr
530 535 540

Ser Asp Phe Arg Gln Thr His Ser Cys Val Ser Glu His Ser Ser Ile
545 550 555 560

Ser Val Leu Asn Ile Thr Pro Glu Glu Ser Lys Pro Ser Glu Val Ala
565 570 575

Arg Glu Ser Thr Asp Gln Lys Trp Ser Val Gln Ser Arg Pro Ser Ser
580 585 590

Arg Glu Gly Cys Tyr Ser Gly Cys Ser Ser Ala Phe Arg Ser Ala His
595 600 605

Gly Asp Arg Asp Asp Leu Pro
610 615

<210> 3

<211> 3195

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (79)..(1920)

<223>

<220>

<221> misc_feature

<222> (2422)..(2422)

<223> "n"=any one base of a, t, c, or g

<400> 3

gtaggagagt gacaggagct gttgtgcatg cccagcact gaactgcctt ctcagggacc 60

ctggctctgg gactggct atg gga gat tgg atg act gtt aca gat cca gtt 111

Met Gly Asp Trp Met Thr Val Thr Asp Pro Val

1

5

10

ctg tgt aca gaa aac aaa aat ctc tct caa tat acc tca gaa aca aag 159

Leu Cys Thr Glu Asn Lys Asn Leu Ser Gln Tyr Thr Ser Glu Thr Lys

15

20

25

atg tct ccg tca agt tta tac tcg cag caa gta ctg tgc tct gca aca 207

Met Ser Pro Ser Ser Leu Tyr Ser Gln Gln Val Leu Cys Ser Ala Thr

30

35

40

cct tta tcc aag aat gtg cat ggt gtt ttc agt gcc ttc tgc aca gga 255

Pro Leu Ser Lys Asn Val His Gly Val Phe Ser Ala Phe Cys Thr Gly

45	50	55	
gag aac atc gaa cag agt att tgc tat ctt gat cag gaa ctg act acc			303
Glu Asn Ile Glu Gln Ser Ile Ser Tyr Leu Asp Gln Glu Leu Thr Thr			
60	65	70	75
ttc ggt ttc cct tcc ttg tat gaa gaa tcc aaa agt aag gag gcg aag			351
Phe Gly Phe Pro Ser Leu Tyr Glu Glu Ser Lys Ser Lys Glu Ala Lys			
	80	85	90
cga gag tta agt ata gtt gct ctt ctg aac tgc atg aat gag ctg ctt			399
Arg Glu Leu Ser Ile Val Ala Leu Leu Asn Cys Met Asn Glu Leu Leu			
	95	100	105
gtg ctt cag cgg aag aac ctc ctg gcc cag gaa agc gtg gag aca cag			447
Val Leu Gln Arg Lys Asn Leu Leu Ala Gln Glu Ser Val Glu Thr Gln			
110	115	120	
aat ctg aag ctg ggc agt gac atg gac cac ctg cag agc tgc tac gcc			495
Asn Leu Lys Leu Gly Ser Asp Met Asp His Leu Gln Ser Cys Tyr Ala			
125	130	135	
aaa ctt aag gaa cag ttg gag gcc tcc agg cga gag atg atc agc ctt			543
Lys Leu Lys Glu Gln Leu Glu Ala Ser Arg Arg Glu Met Ile Ser Leu			
140	145	150	155
cag gag aga gac aga cag cta cag tgc aaa aac agg aat ttg cat cag			591
Gln Glu Arg Asp Arg Gln Leu Gln Cys Lys Asn Arg Asn Leu His Gln			
	160	165	170

ctc ctg aaa aac gag aaa gaa gag gta caa aaa tta caa aat atc ata 639
Leu Leu Lys Asn Glu Lys Glu Glu Val Gln Lys Leu Gln Asn Ile Ile

175

180

185

gcc agt cgg gct act cag tat aat cat gat gtg aag aga aag gag cgg 687
Ala Ser Arg Ala Thr Gln Tyr Asn His Asp Val Lys Arg Lys Glu Arg

190

195

200

gag tac aat aaa ctg aag gag cgt ctg cat cag ctt gtt atg aac aag 735
Glu Tyr Asn Lys Leu Lys Glu Arg Leu His Gln Leu Val Met Asn Lys

205

210

215

aag gat aaa aat ata gcc atg gac gtt tta aat tac gtg ggc cga gtg 783
Lys Asp Lys Asn Ile Ala Met Asp Val Leu Asn Tyr Val Gly Arg Val
220 225 230 235

gat gga aag cga ggc tcc tgg agg act gat aaa aca gaa gcc agg aat 831
Asp Gly Lys Arg Gly Ser Trp Arg Thr Asp Lys Thr Glu Ala Arg Asn

240

245

250

gaa gat gaa atg tac aaa att ctg ctg aat gat tat gag tac cgc cag 879
Glu Asp Glu Met Tyr Lys Ile Leu Leu Asn Asp Tyr Glu Tyr Arg Gln

255

260

265

aag cag atc ctg ctg gag aat gcg gag ctg aag aag gtc ctc cag cag 927
Lys Gln Ile Leu Leu Glu Asn Ala Glu Leu Lys Lys Val Leu Gln Gln

270

275

280

atg aag aaa gag atg atc tct ctc ctt tct cct caa aag aag aaa ccc 975
Met Lys Lys Glu Met Ile Ser Leu Leu Ser Pro Gln Lys Lys Lys Pro
285 290 295

aga gaa aga gca gag gac agc aca ggc act gtt gtc atc tcc gat gta 1023
Arg Glu Arg Ala Glu Asp Ser Thr Gly Thr Val Val Ile Ser Asp Val
300 305 310 315

gaa gac gac gct ggg gag ctg agc aga gat ggt gtg tgg agc ctt tcc 1071
Glu Asp Asp Ala Gly Glu Leu Ser Arg Asp Gly Val Trp Ser Leu Ser
320 325 330

tgt gac act gtc agg gag cag ctt aca aac agc atc agg aag cag tgg 1119
Cys Asp Thr Val Arg Glu Gln Leu Thr Asn Ser Ile Arg Lys Gln Trp
335 340 345

aga att ctg aaa agc cat gtg gaa aaa ctt gat aac caa gct tca aag 1167
Arg Ile Leu Lys Ser His Val Glu Lys Leu Asp Asn Gln Ala Ser Lys
350 355 360

gta cac tca gag ggc ttt cat gaa gag gac gtc atc tca cga caa gac 1215
Val His Ser Glu Gly Phe His Glu Glu Asp Val Ile Ser Arg Gln Asp
365 370 375

cat gag caa gag act gag aaa ctg gag ctg gag att gag cgg tgt aaa 1263
His Glu Gln Glu Thr Glu Lys Leu Glu Leu Glu Ile Glu Arg Cys Lys
380 385 390 395

gag atg atc aag gct cag cag cag ctc tta cag caa cag ctg gcc act 1311

Glu Met Ile Lys Ala Gln Gln Gln Leu Leu Gln Gln Gln Leu Ala Thr	
400 405 410	
gcg tgt gat gac gac acc acc tca ctg ttg cga gac tgt tac ttg ctt	1359
Ala Cys Asp Asp Asp Thr Thr Ser Leu Leu Arg Asp Cys Tyr Leu Leu	
415 420 425	
gaa gaa aag gaa cgc ctt aaa gaa gag tgg tcc ctt ttt aaa gag caa	1407
Glu Glu Lys Glu Arg Leu Lys Glu Glu Trp Ser Leu Phe Lys Glu Gln	
430 435 440	
aaa aag aat ttt gag aga gaa aga cga agc ttt aca gaa gct gct att	1455
Lys Lys Asn Phe Glu Arg Glu Arg Arg Ser Phe Thr Glu Ala Ala Ile	
445 450 455	
cgc ttg ggg ttg gag aga aag gcg ttt gag gaa gag cga gcc agc tgg	1503
Arg Leu Gly Leu Glu Arg Lys Ala Phe Glu Glu Glu Arg Ala Ser Trp	
460 465 470 475	
gtg aag cag cag ttt tta aac atg acg acc ttt gat cac cag aac tca	1551
Val Lys Gln Gln Phe Leu Asn Met Thr Thr Phe Asp His Gln Asn Ser	
480 485 490	
gaa aat gtg aaa ctt ttc agt gcc ttt tca gga agt tct gat cca gac	1599
Glu Asn Val Lys Leu Phe Ser Ala Phe Ser Gly Ser Ser Asp Pro Asp	
495 500 505	
aat ctt ata gtc cac cca cgg cca cgg caa aag aag cca cac agt gtc	1647
Asn Leu Ile Val His Pro Arg Pro Arg Gln Lys Lys Pro His Ser Val	

510	515	520	
gct aat ggg gtg cca gct tgc aca tcc aaa ctg gct aag tct ctt ccg			1695
Ala Asn Gly Val Pro Ala Cys Thr Ser Lys Leu Ala Lys Ser Leu Pro			
525	530	535	
acc tca cct tca gac ttc tgc ccg tct cgc tca tgt gtg tct gag cac			1743
Thr Ser Pro Ser Asp Phe Cys Pro Ser Arg Ser Cys Val Ser Glu His			
540	545	550	555
agt ccc gtc agt gcg ctg act gtg act cct gaa gaa acc aaa ccg aat			1791
Ser Pro Val Ser Ala Leu Thr Val Thr Pro Glu Glu Thr Lys Pro Asn			
560	565	570	
gag gtt gga aga gaa agt acg gac cag aag tgg agc gtg gtg tcc aga			1839
Glu Val Gly Arg Glu Ser Thr Asp Gln Lys Trp Ser Val Val Ser Arg			
575	580	585	
ccc agc tcc cgg gag ggt tgc tac ggt gga tgc tcc tcg gcc tac aca			1887
Pro Ser Ser Arg Glu Gly Cys Tyr Gly Gly Cys Ser Ser Ala Tyr Thr			
590	595	600	
agc tcc cac gtg gaa cga gat gac tta cca tag gtgctcgggc tgcagcgctg			1940
Ser Ser His Val Glu Arg Asp Asp Leu Pro			
605	610		
tcctggagtg catgagagga attgacacgg ggtgtagcat aaagtcagcc atctaccgta			2000
agatgtcgga gttatttgtt tggacttccc agtctttccc caaagagctg aaacgcttta			2060

gaggatgcga aagctttggc tgtgtgttag taacagaagc ctctggctct gtgagtaaag 2120

gaatgtatgg tgtttggtgg gaaacaaaag cacgagaatg atttcctctt ccgggtactg 2180

agaatagcac ttttagggac tgattcttgt aaacattaaa ttttgtccc aagtatggtt 2240

ggcattggaa gtttagtctt tacttgaatg tacactgtag atttttaaca aagcagttct 2300

atatttatta tgtttagtgt gattttggga ttacctcttt catatgtttt ctgcctgtac 2360

ataaatatac atgactatgt taagaggctt taaggtttaa aaatttcaca ccatgctcga 2420

gnatagcatt tcatgccaat taaaatgttt tcagtggcat ggtgtttaca gatgtgttag 2480

gaccactgcc acatgacagt taagatttta tttttaagcc atttgggcaa taaaaattca 2540

aagccacttc ataagctaag ttcagatagc taaaactact aacattacat ttttgagatt 2600

tataaagcat tatattttat tttatatatg tgactgttat aatttctaag aggaatgtgg 2660

attatgaagc aatgggggaa agacagaagt gactaatagt gcaagagcat tgggtgaagg 2720

gacggctgat gaggatatgg gagacctggg tggatgctt ttccttaccg acggtgcggt 2780

gcggcgatct ctgtaccgcc agggctttct atcattgcca atacttttgt aattaaagag 2840

attttcaact acataccact actaaagtaa gacagtgtaa aactttggct tttgtaattg 2900

acactctgga cactggtgtg ttgttcattt ctagaacaat cgtaggctct tttctctgtt 2960

tctgctgcat gtttcttcat gagaagtatg ttactattga cagtaatgac actgacagtg 3020

actgtagacg taggcccaga cttctcctgg gtggattttc atccagcagc ttttaagtgc 3080

ctcgccctgc tcgtctctgc acatagccgc cgacacaagc cctcgcttga tgatgcagat 3140

agtccatctg cttttctctc cccttgcct gctatgactg ttgcattaaa ttcatt 3195

<210> 4

<211> 613

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 4

Met Gly Asp Trp Met Thr Val Thr Asp Pro Val Leu Cys Thr Glu Asn

1 5 10 15

Lys Asn Leu Ser Gln Tyr Thr Ser Glu Thr Lys Met Ser Pro Ser Ser

20 25 30

Leu Tyr Ser Gln Gln Val Leu Cys Ser Ala Thr Pro Leu Ser Lys Asn

35 40 45

Val His Gly Val Phe Ser Ala Phe Cys Thr Gly Glu Asn Ile Glu Gln

50 55 60

Ser Ile Ser Tyr Leu Asp Gln Glu Leu Thr Thr Phe Gly Phe Pro Ser
65 70 75 80

Leu Tyr Glu Glu Ser Lys Ser Lys Glu Ala Lys Arg Glu Leu Ser Ile
85 90 95

Val Ala Leu Leu Asn Cys Met Asn Glu Leu Leu Val Leu Gln Arg Lys
100 105 110

Asn Leu Leu Ala Gln Glu Ser Val Glu Thr Gln Asn Leu Lys Leu Gly
115 120 125

Ser Asp Met Asp His Leu Gln Ser Cys Tyr Ala Lys Leu Lys Glu Gln
130 135 140

Leu Glu Ala Ser Arg Arg Glu Met Ile Ser Leu Gln Glu Arg Asp Arg
145 150 155 160

Gln Leu Gln Cys Lys Asn Arg Asn Leu His Gln Leu Leu Lys Asn Glu
165 170 175

Lys Glu Glu Val Gln Lys Leu Gln Asn Ile Ile Ala Ser Arg Ala Thr
180 185 190

Gln Tyr Asn His Asp Val Lys Arg Lys Glu Arg Glu Tyr Asn Lys Leu
195 200 205

Lys Glu Arg Leu His Gln Leu Val Met Asn Lys Lys Asp Lys Asn Ile
210 215 220

Ala Met Asp Val Leu Asn Tyr Val Gly Arg Val Asp Gly Lys Arg Gly
225 230 235 240

Ser Trp Arg Thr Asp Lys Thr Glu Ala Arg Asn Glu Asp Glu Met Tyr
245 250 255

Lys Ile Leu Leu Asn Asp Tyr Glu Tyr Arg Gln Lys Gln Ile Leu Leu
260 265 270

Glu Asn Ala Glu Leu Lys Lys Val Leu Gln Gln Met Lys Lys Glu Met
275 280 285

Ile Ser Leu Leu Ser Pro Gln Lys Lys Lys Pro Arg Glu Arg Ala Glu
290 295 300

Asp Ser Thr Gly Thr Val Val Ile Ser Asp Val Glu Asp Asp Ala Gly
305 310 315 320

Glu Leu Ser Arg Asp Gly Val Trp Ser Leu Ser Cys Asp Thr Val Arg
325 330 335

Glu Gln Leu Thr Asn Ser Ile Arg Lys Gln Trp Arg Ile Leu Lys Ser
340 345 350

His Val Glu Lys Leu Asp Asn Gln Ala Ser Lys Val His Ser Glu Gly
355 360 365

Phe His Glu Glu Asp Val Ile Ser Arg Gln Asp His Glu Gln Glu Thr

370

375

380

Glu Lys Leu Glu Leu Glu Ile Glu Arg Cys Lys Glu Met Ile Lys Ala

385

390

395

400

Gln Gln Gln Leu Leu Gln Gln Gln Leu Ala Thr Ala Cys Asp Asp Asp

405

410

415

Thr Thr Ser Leu Leu Arg Asp Cys Tyr Leu Leu Glu Glu Lys Glu Arg

420

425

430

Leu Lys Glu Glu Trp Ser Leu Phe Lys Glu Gln Lys Lys Asn Phe Glu

435

440

445

Arg Glu Arg Arg Ser Phe Thr Glu Ala Ala Ile Arg Leu Gly Leu Glu

450

455

460

Arg Lys Ala Phe Glu Glu Glu Arg Ala Ser Trp Val Lys Gln Gln Phe

465

470

475

480

Leu Asn Met Thr Thr Phe Asp His Gln Asn Ser Glu Asn Val Lys Leu

485

490

495

Phe Ser Ala Phe Ser Gly Ser Ser Asp Pro Asp Asn Leu Ile Val His

500

505

510

Pro Arg Pro Arg Gln Lys Lys Pro His Ser Val Ala Asn Gly Val Pro

515

520

525

Ala Cys Thr Ser Lys Leu Ala Lys Ser Leu Pro Thr Ser Pro Ser Asp
530 535 540

Phe Cys Pro Ser Arg Ser Cys Val Ser Glu His Ser Pro Val Ser Ala
545 550 555 560

Leu Thr Val Thr Pro Glu Glu Thr Lys Pro Asn Glu Val Gly Arg Glu
565 570 575

Ser Thr Asp Gln Lys Trp Ser Val Val Ser Arg Pro Ser Ser Arg Glu
580 585 590

Gly Cys Tyr Gly Gly Cys Ser Ser Ala Tyr Thr Ser Ser His Val Glu
595 600 605

Arg Asp Asp Leu Pro
610

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 5

cgtaggagag tgacaggagc tg

22

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 6

ggttatcgag tttttctaca tgac

24

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 7

cgtaggagag tgacaggagc tg

22

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 8

ttcctgtttt tgcactgtag ctg

23

【図面の簡単な説明】

【図 1】 アファデインのDILドメインへのADIPの結合を示す図および写真である。

(A) : アファデインの概略構造。RA、Ras会合ドメイン；FHA、フォークヘッド会合ドメイン；DIL、希釈ドメイン；PDZ、PDZドメイン；PR、プロリンリッチドメイン。

(B) : アファデインのDILドメインへのADIPの特異的結合を示す、酵母二重ハイブリッドアッセイ。

【図 2】 ADIPのアミノ酸配列を示す図および写真である。

(A) : ラットADIP、マウスADIPおよびヒトKIAA0923の推定アミノ酸配列。グレーの塗りつぶしは、同一配列を表わす。推定上のコイル状コイルドメインには下線を付した。

(B) : 天然および組換えADIPタンパク質の分子量を比較した図である。pCMV HA mADIPをHEK293細胞にトランスフェクトし、細胞溶解物をSDS-PAGE（10%ポリアクリルアミドゲル）にかけ、続いて抗ADIP Ab（M57）を用いてウエスタンブロットを行った。対照であるHEK293細胞およびMDCK細胞の細胞溶解物も同様にSDS-PAGEにかけ、続いてウエスタンブロットを行った。レーン1、対照HEK293細胞（タンパク質1 μ g）；レーン2、pCMV HA mADIP-トランスフェクトHEK293細胞（タンパク質1 μ g）；およびレーン3、MDCK細胞（タンパク質1 μ g）。

【図 3】 ADIPのアファデインへのインビトロおよびインビボ結合を示す図およ

び写真である。

(A) : マウスADIPの概略構造。CC、コイル状コイルドメイン。ADIPのアファディンまたは α -アクチン結合領域の酵母二重ハイブリッド解析。ADIP、アファディン (DILドメイン) および α -アクチニンはpGBDUまたはpGAD内に構築され、レポーター酵母菌株に同時形質転換された。HIS3およびADE2レポーター遺伝子の発現によって示されるように、アファディンまたは α -アクチニンへのADIPの結合は、それぞれヒスチジンおよびアデニンが欠如した合成完全培地上での増殖を評価することによって計測した。+、相互作用あり；-、相互作用なし；およびNT、試験せず。

(B) : FLAGタグ化mADIP-Cを持つアファディンのT7タグ化DILドメインの共免疫沈降。発現ベクターは図示されているように、HEK293細胞内にトランスフェクトされた。アファディンのT7タグ化DILドメインは、抗T7および抗Flag mAbを用いたウエスタンブロットによって示されるように、Flagタグ化mADIP-Cと特異的に共免疫沈降した。

(C) : MBP-mADIPへのアファディンのインビトロ結合。MDCK細胞の抽出物を、アミロース樹脂ビーズ上に固定化されたMBPまたはMBP-mADIP (全長) とインキュベートした。次にビーズをSDS-PAGE (10% ポリアクリルアミドゲル) にかけて、続いて抗アファディン mAbを用いてウエスタンブロットを行った。

(D) : 内因性アファディンと、MDCK細胞による内因性ADIPとの共免疫沈降。MDCK細胞の溶解物は、抗ADIP抗体 (M05) と免疫沈降させ、抗ADIP pAb (M05) および抗アファディン mAbを用いてウエスタンブロットによって解析した。結果は3つの独立した実験の代表である。

【図 4】 ADIPの組織および亜細胞分布を示す写真である。

(A) : ノーザンブロット解析。マウスRNAブロット膜 (Clontech) をADIP cDNAの³²P標識断片 (bp 552~3194) によってハイブリダイズし、続いてオートラジオグラフィーを行った。レーン1、心臓；レーン2、脳；レーン3、脾臓；レーン4、肺；レーン5、肝臓；レーン6、骨格筋；レーン7、腎臓；およびレーン8、精巢 (短期暴露)。

(B) ウエスタンブロット解析。種々のマウス組織のホモジネート (それぞれタ

ンパク質30 μ g)をSDS-PAGE(10%ポリアクリルアミドゲル)にかけ、続いて抗ADIP Ab(M57)を用いてウエスタンブロットを行った。レーン1、心臓；レーン2、脳；レーン3、脾臓；レーン4、肺；レーン5、肝臓；レーン6、骨格筋；レーン7、腎臓；レーン8、精巣およびレーン9、MDCK細胞。

(C)：ラット肝臓におけるADIPの亜細胞分布。ラット肝臓の亜細胞分画を実施し、各画分(それぞれタンパク質30 μ g)をSDS-PAGE(10%ポリアクリルアミドゲル)にかけ、続いて抗ADIP pAb(M57)または抗アフアディン mAbを用いてウエスタンブロットを行った。レーン1、ホモジネート画分；レーン2、可溶性画分；レーン3、ペレット画分；レーン4、毛細胆管に豊富な画分；そしてレーン5、AJsおよびTJsに豊富な画分。結果は3つの独立した実験の代表である。

【図5】 MDCK細胞内のAJsにおけるADIPの局在化を示す写真である。MDCK細胞は、抗ADIP(M05)、抗アフアディン、抗ビנקリンAbsの種々の組み合わせによって二重染色した。

(A)、ADIPおよびアフアディン；(B)、ADIPおよびビנקリン。バーは、10 μ m。結果は3つの独立した実験の代表である。

【図6】 ネクチン-2 α -L細胞におけるアフアディンとのADIPの同時局在化を示す写真である。

(A)：ネクチン-2 α をベースとした細胞-細胞接着部位へのADIPの補充。一時的にHAタグ化ADIP(rADIP-C；aa159~613)を発現するネクチン-2 α -L細胞を、抗HAおよび抗アフアディン mAbによって二重染色した。矢印は、ネクチン-2 α をベースとした細胞-細胞接着部位。

(B)：ネクチン-2 α - Δ Cをベースとした細胞-細胞接着部位へのADIPの補充なし。一時的にHAタグ化ADIP(rADIP-C；aa159~613)を発現するネクチン-2 α - Δ C-L細胞を、抗HAおよび抗アフアディンmAbによって二重染色した。矢印は、ネクチン-2 α - Δ Cをベースとした細胞-細胞接着部位。バーは10 μ m。結果は3つの独立した実験の代表である。

【図7】 マウス小腸吸収上皮細胞中のAJsにおけるADIPおよびアフアディンの同時局在化を示す写真である。

(A) および (B)：ADIP、アフアディンおよびZO-1の局在化。(A)において、

凍結切片は抗ADIP pAb (M01) および抗アファディンならびに抗ZO-1 mAbによって三重染色した。(B)において、凍結切片は、抗ADIP pAb (M01) および抗アファディン mAb (左) によって、抗ADIP pAb (M01) および抗ZO-1 mAb (右) によって二重染色した。矢印はアファディンシグナルと同時局在化したADIPシグナル。矢はZO-1シグナルよりもやや基底側に局在化したADIPシグナル。バーは、 $10\mu\text{m}$ 。

(C) : マウス小腸吸収上皮細胞におけるADIPの超微細局在化。マウス小腸吸収上皮細胞は、超薄凍結切片技法を用いて、抗ADIP pAb (M01) によって標識した。AJ、接着結合; DS、デスモソーム; TJ、密着結合; およびバーは $0.1\mu\text{m}$ 。(D) : マウス心細胞内の細胞マトリックス結合におけるADIPの不在。凍結切片は、抗ADIP pAb (M01) および抗ビンクリンmAbによって二重染色した。矢印は、介在板; 矢はコストメア; およびバーは $50\mu\text{m}$ 。結果は3つの独立した実験の代表である。

【図8】 MDCK細胞におけるAJsおよびTJsよりなる接合部複合体の破壊および形成の間のADIPの挙動を示す写真である。MDCK細胞は、抗ADIP (M05)、抗アファディンおよび抗E-カドヘリンAbによって三重染色した。

(A) : 2mM Ca^{2+} (正常 Ca^{2+}) にて培養した細胞におけるADIP、アファディンおよびE-カドヘリンの局在化。

(B) : 培地 Ca^{2+} の正常濃度から低濃度への減少による、形質膜からのADIPの免疫蛍光シグナルの消失。MDCK細胞は $2\mu\text{M Ca}^{2+}$ にて120分間培養した (低 Ca^{2+})。

(C) : Ca^{2+} 濃度の低濃度から正常濃度への増加による、細胞-細胞接着部位へのADIPの補充。MDCK細胞は $2\mu\text{M Ca}^{2+}$ にて120分間培養し、次に 2mM Ca^{2+} によって60分間インキュベートした (低 Ca^{2+} + 正常 Ca^{2+})。

(D) : TPA誘発TJ様構造へのADIPの補充なし。MDCK細胞は $2\mu\text{M Ca}^{2+}$ にて120分間培養し、次に 100nM TPA によって60分間インキュベートした (低 Ca^{2+} + TPA)。バーは $10\mu\text{m}$ 。結果は3つの独立した実験の代表である。

【図9】 α -アクチニンへのADIPのインビボ結合を示す写真である。(A) : α -アクチニン-1の概略構造。CH、カルポニン相同体ドメイン; SPEC、スペクトリ

ン様反復；およびEF、EFハンド。 α -アクチニン-1のADIP結合領域の酵母二重ハイブリッド解析。HIS3およびADE2レポーター遺伝子の発現によって示されるように、ADIPへの α -アクチニン-1の結合は、それぞれヒスチジンおよびアデニンが欠如した合成完全培地上での増殖を評価することによって計測した。+、相互作用あり；+/-、弱い相互作用あり；および-、相互作用なし。

(B)：HAタグ化 α -アクチニン-1-CとFlagタグ化mADIP-Mとの共免疫沈降。発現ベクターは図示したように、HEK293細胞にトランスフェクトされた。HAタグ化 α -アクチニン-1-Cは、抗HAおよび抗Flag mAbによるウエスタンブロットによって示されるように、Flagタグ化mADIP-Mと特異的に共免疫沈降した。

(C)：内因性 α -アクチニンとFlagタグ化mADIP-Mの共免疫沈降。発現ベクターは図示したように、HEK293細胞にトランスフェクトされた。内因性 α -アクチニン-1は、抗 α -アクチニンpAbおよび抗Flag mAbによるウエスタンブロットによって示されるように、Flagタグ化mADIP-Mと特異的に共免疫沈降した。

(D)：内因性 α -アクチニンおよび内因性アフアディンと、MDCK細胞による内因性ADIPとの共免疫沈降。MDCK細胞の溶解物は、抗ADIP抗体(M05)と免疫沈降させ、抗ADIP(M05)、抗 α -アクチニンおよび抗アフアディン Abを用いたウエスタンブロットによって解析した。結果は3つの独立した実験の代表である。

【図 1 0】 MDCK細胞およびマウス小腸吸収上皮細胞内のAJsにおける α -アクチニンおよびADIPの局在化を示す写真である。

(A)：MDCK細胞におけるADIPおよび α -アクチニンの局在化。細胞は、抗ADIP pAb (M05) および抗 α -アクチニンmAbによって二重染色した。

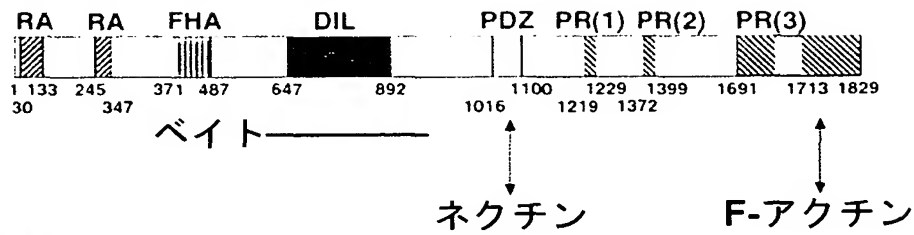
(B)：マウス小腸吸収上皮細胞におけるADIPおよび α -アクチニンの局在化。凍結切片は、抗ADIP pAb (M01) および抗 α -アクチニンmAbによって三重染色した。バーは、10 μ m。結果は3つの独立した実験の代表である。

【書類名】 図面

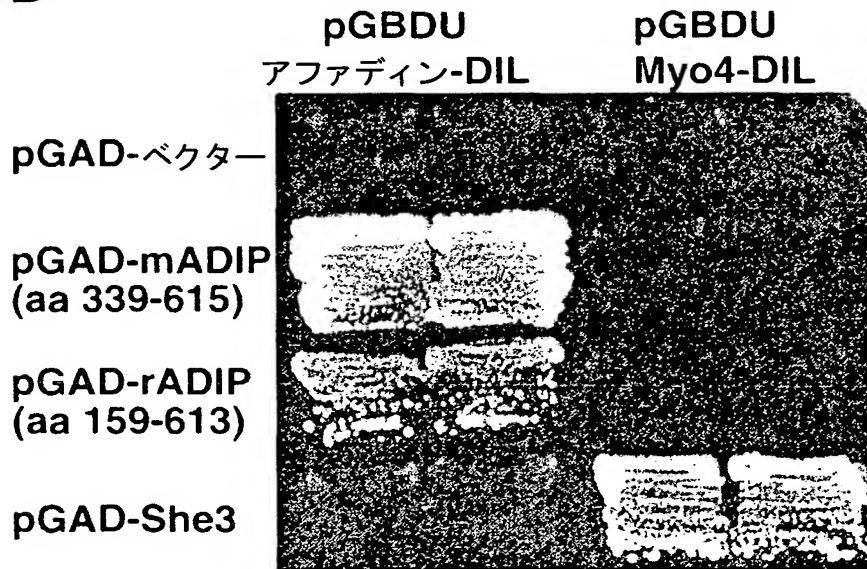
【図 1】

A

アフアディン(1829 aa.)



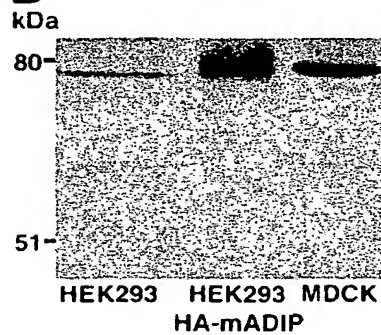
B



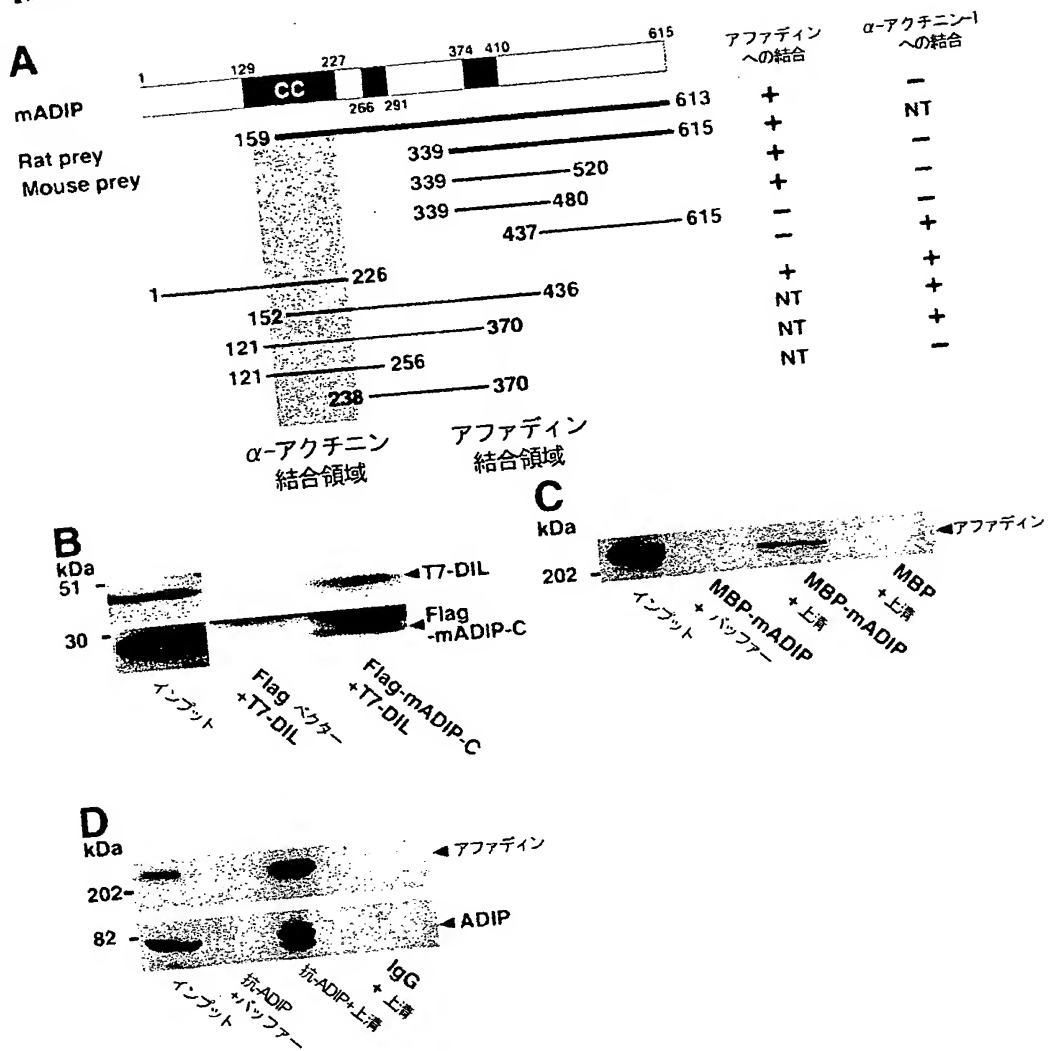
【図 2】

A

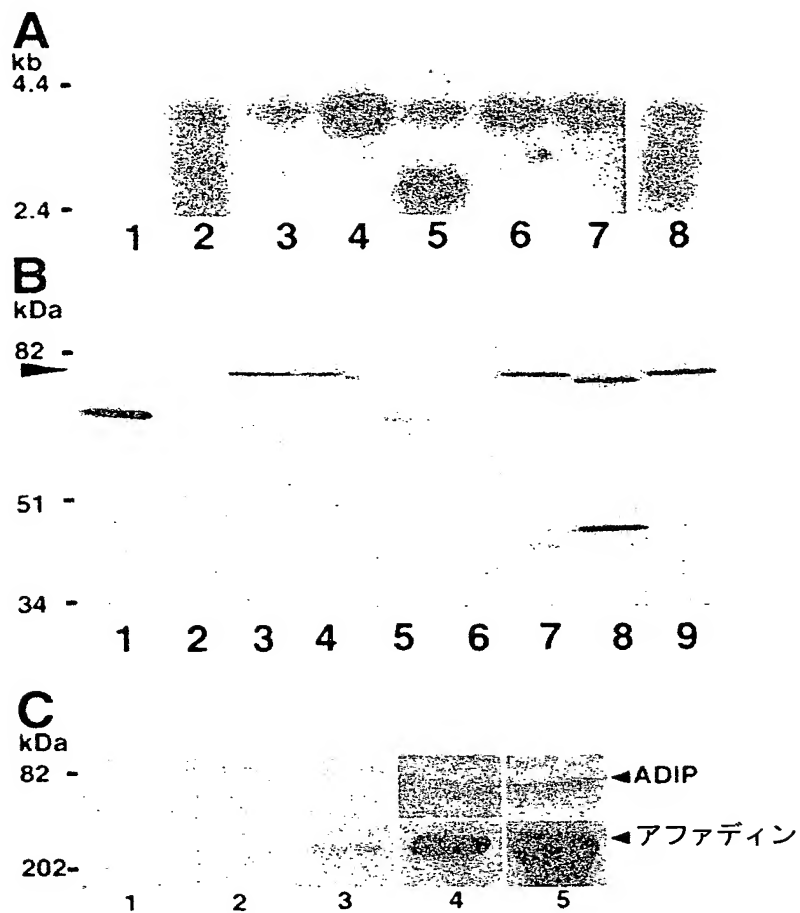
mADIP	NGQHTVTDP	VLC TENHCLS	QVTSETKQSP	SSLVSDQVLC	SATPLSKMWH	GVFSFCTGE	NIEQSISVLD	QELTTFGFP	LYEESKSKEA	KRELIVALL	100
mADIP	NGQHTVTDP	VLC TENHCLS	QVTSETKQSP	SSLVSDQVLC	SSVPLSKMWH	GVFGVCTGE	NIEQSISVLD	QELTTFGFP	LYEESKSKEA	KRELIVALL	100
K1RA0923	NGQHTVTDP	GLSSEKTIIS	QVTSETKQSP	SSLVSDQVLC	SSVPLSKMWH	SFFSFCCTED	NIEQSISVLD	QELTTFGFP	LYEESKSKET	KRELIVALL	100
mADIP	NCNRELLVLO	RCNLLAQESV	ETQNLKLSO	MDHLQSCVVK	LKEQLEASRA	ENISLQERDR	QLQCKNRLM	QLLKMEKEEV	QKLOHIIASA	ATQVHMDVOR	100
mADIP	NCNRELLVLO	RCNLLAQESV	ETQNLKLSO	MDHLQSCVVK	LKEQLETSRA	ENISLQERDR	QLQCKNRLM	QLLKMEKDEV	QKLOHIIASA	ATQVHMDVOR	100
K1RA0923	NCNRELLVLO	RCNLLAQENY	ETQNLKLSO	MDHLQSCVSK	LKEQLETSRA	ENISLQERDR	QLQCKNRLM	QLLKMEKDEV	QKLOHIIASA	ATQVHMDVOR	100
mADIP	KEREYNKLE	RLNOLVHKK	DKIIRANDVLN	VVGARQGRG	SHRTGKTEAR	NEDEMYKILL	NDVEYRQKI	LLENRELQKV	LOQPKKEHIS	LLSPQKQKPR	100
mADIP	KEREYNKLE	RLNOLVHKK	DKIIRANDVLN	VVGARQGRG	SHRTGKTEAR	NEDEMYKILL	NDVEYRQKI	LLENRELQKV	LOQPKKEHIS	LLSPQKQKPR	100
K1RA0923	KEREYNKLE	RLNOLVHKK	DKIIRANDVLN	VVGARQGRG	SHRTGKTEAR	NEDEMYKILL	NDVEYRQKI	LLENRELQKV	LOQPKKEHIS	LLSPQKQKPR	100
mADIP	ERAEDSTGT	VISDVEDAG	ELSDQVMVL	SCDTYREQLT	NSIRKQRIIL	KSHVEKLQD	ASKVHSEGFH	EEDVLSRQDH	EQETEXLELE	IERCKEHIKA	400
mADIP	ERAEDSTGT	VISDVEDAG	ELSDQVMVL	SCDTYREQLT	NSIRKQRIIL	KSHVEKLQD	ASKVHSEGFH	EEDVLSRQDH	EQETEXLELE	IERCKEHIKA	400
K1RA0923	ERYDDSTGT	VISDVEDAG	ELSDQVMVL	SCDTYREQLT	NSIRKQRIIL	KSHVEKLQD	ASKVHSEGFH	EEDVLSRQDH	EQETEXLELE	IQCKEHIKT	399
mADIP	QQQLLQQLA	TACDDDTSL	LADCYLLEK	ERLKEEHLF	KEQKQFERE	RASFTEARIR	LGLERKAFEE	ERASHYKQOF	LNHTTFDQHN	SENKLFSAF	500
mADIP	QQQLLQQLA	TTCDDDTSL	LADCYLLEK	ERLKEEHLF	KEQKQFERE	RASFTEARIR	LGLERKAFEE	ERASHYKQOF	LNHTTFDQHN	SENKLFSAF	500
K1RA0923	QQQLLQQLA	TAYDDDTSL	LADCYLLEK	ERLKEEHLF	KEQKQFERE	RASFTEARIR	LGLERKAFEE	ERASHYKQOF	LNHTTFDQHN	SENKLFSAF	499
mADIP	SSSSDQNL	VHSPRQKQ	HSVANGVAC	TSKLTSLPA	SPSTQDFQ	RSCVSEHSE	SVLHTPEE	KPSEVAREET	DQKUSVQSP	SSREGCVGC	599
mADIP	SSSSDQNL	VHSPRQKQ	HSVANGVAC	TSKLTSLPA	SPSTQDFQ	RSCVSEHSE	SVLHTPEE	KPSEVAREET	DQKUSVQSP	SSREGCVGC	599
K1RA0923	SSSSDQNL	VHSPRQKQ	HSVANGVAC	TSKLTSLPA	SPSTQDFQ	RSCVSEHSE	SVLHTPEE	KPSEVAREET	DQKUSVQSP	SSREGCVGC	599
mADIP	SSRYTSHVE	RDOLP									613
mADIP	SSAFASAND	RDOLP									615
K1RA0923	SLSYTHSHVE	RDOLP									614

B

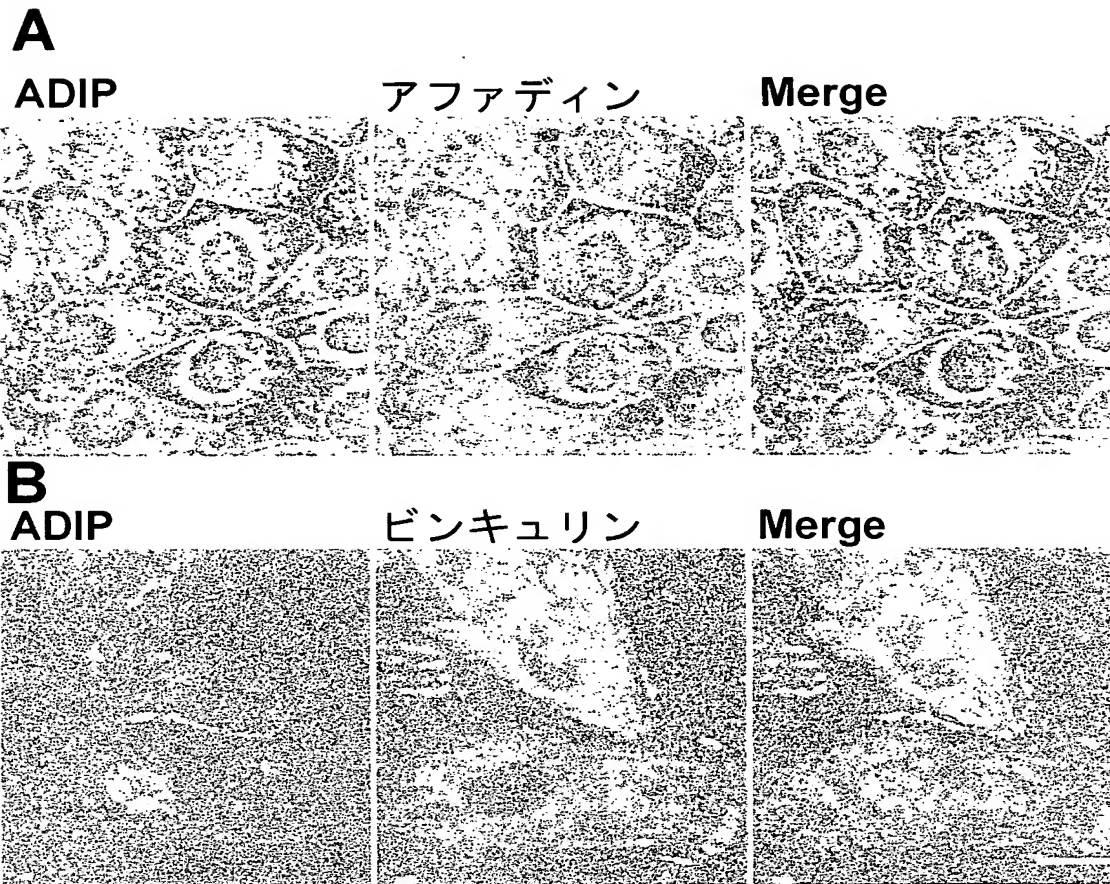
【図3】



【図 4】



【図 5】



【図 6】

A

HA-rADIP-C

アファディン

Merge

**B**

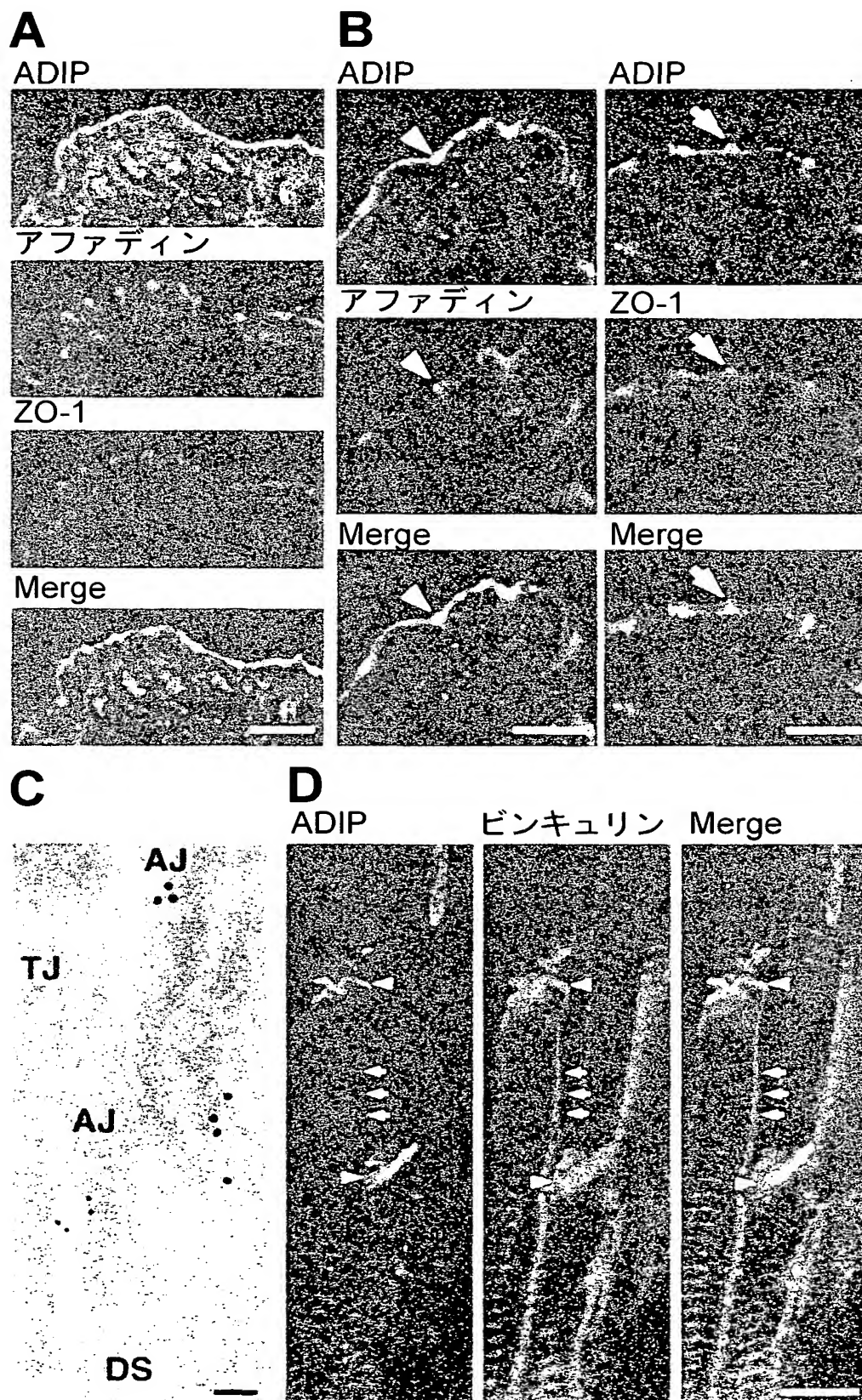
HA-rADIP-C

アファディン

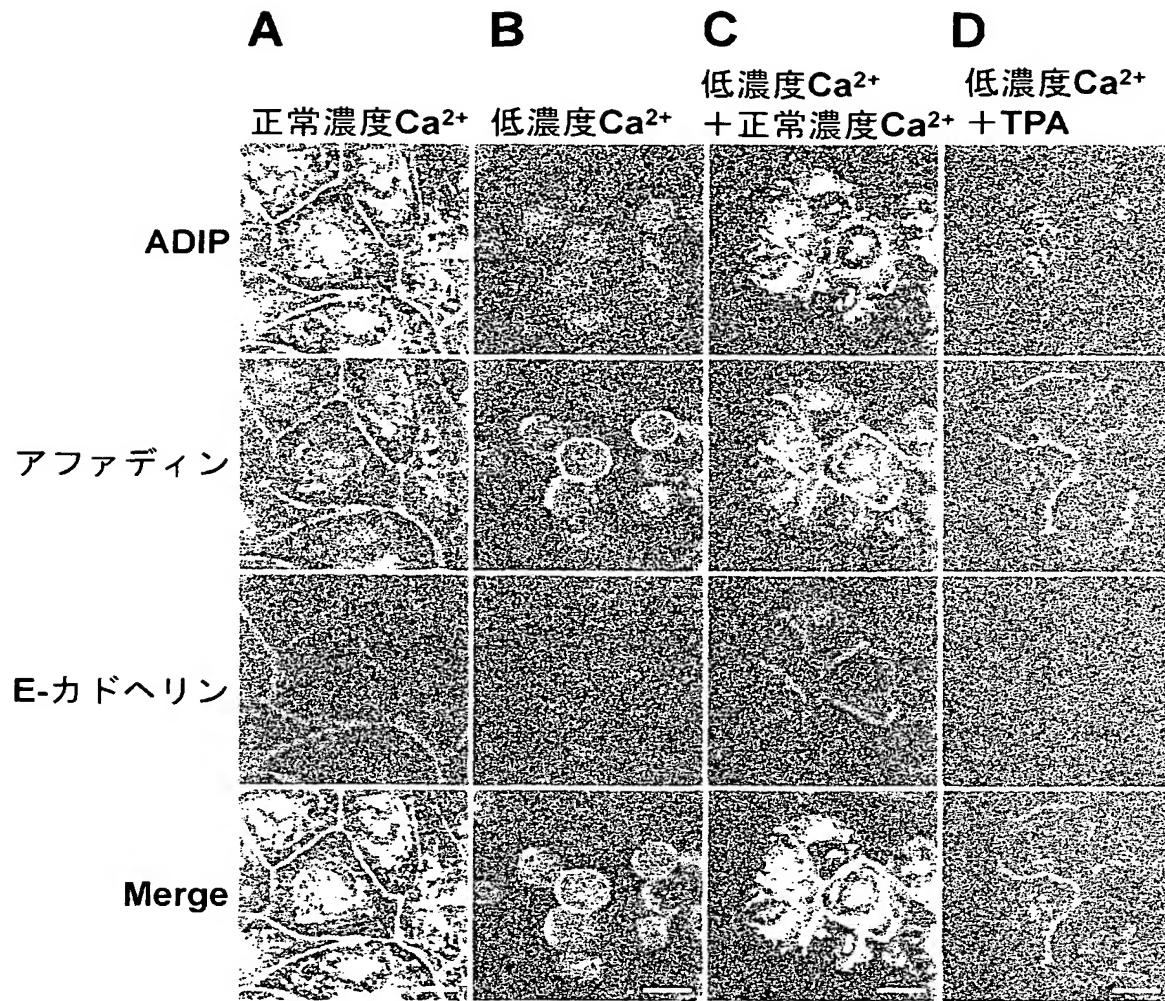
Merge



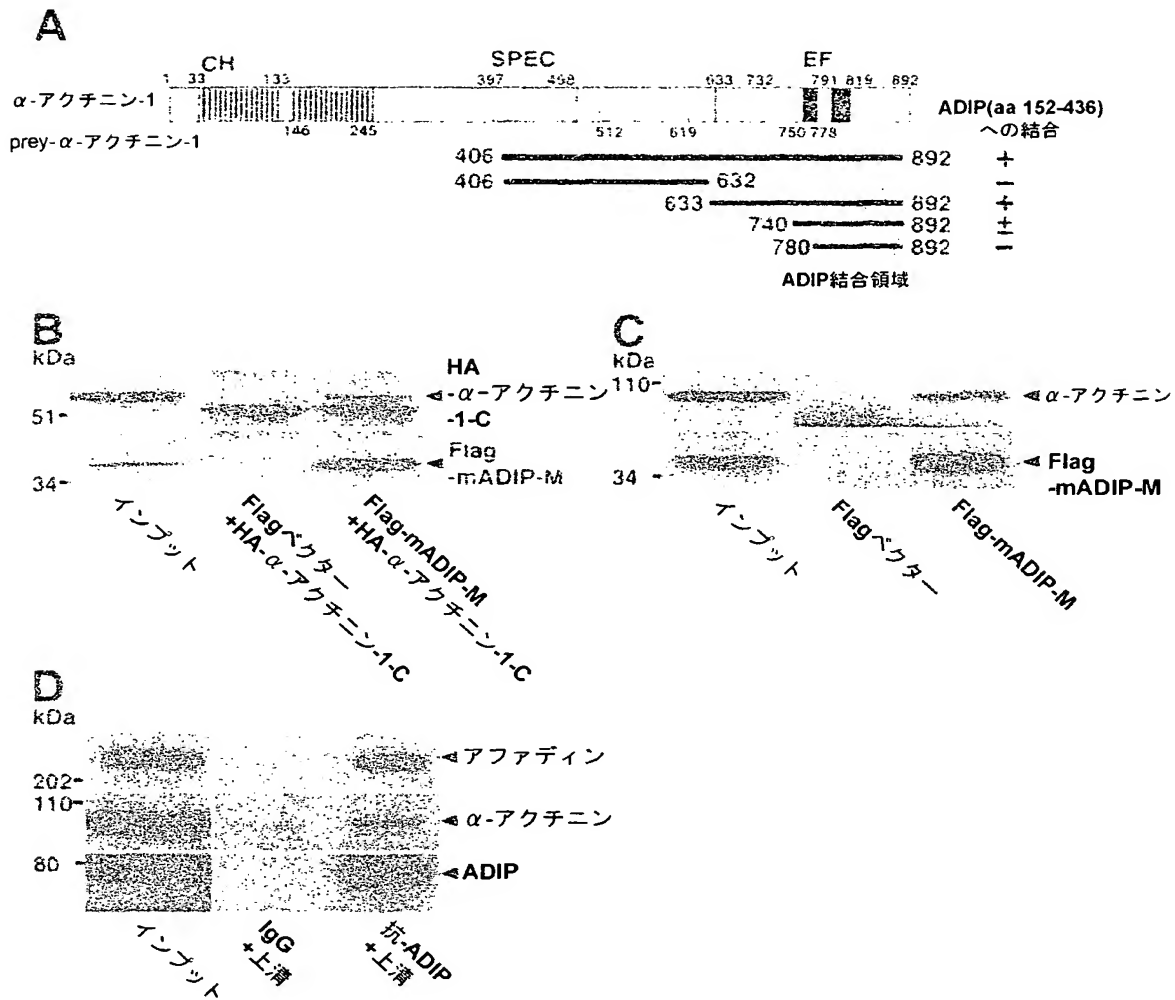
【図 7】



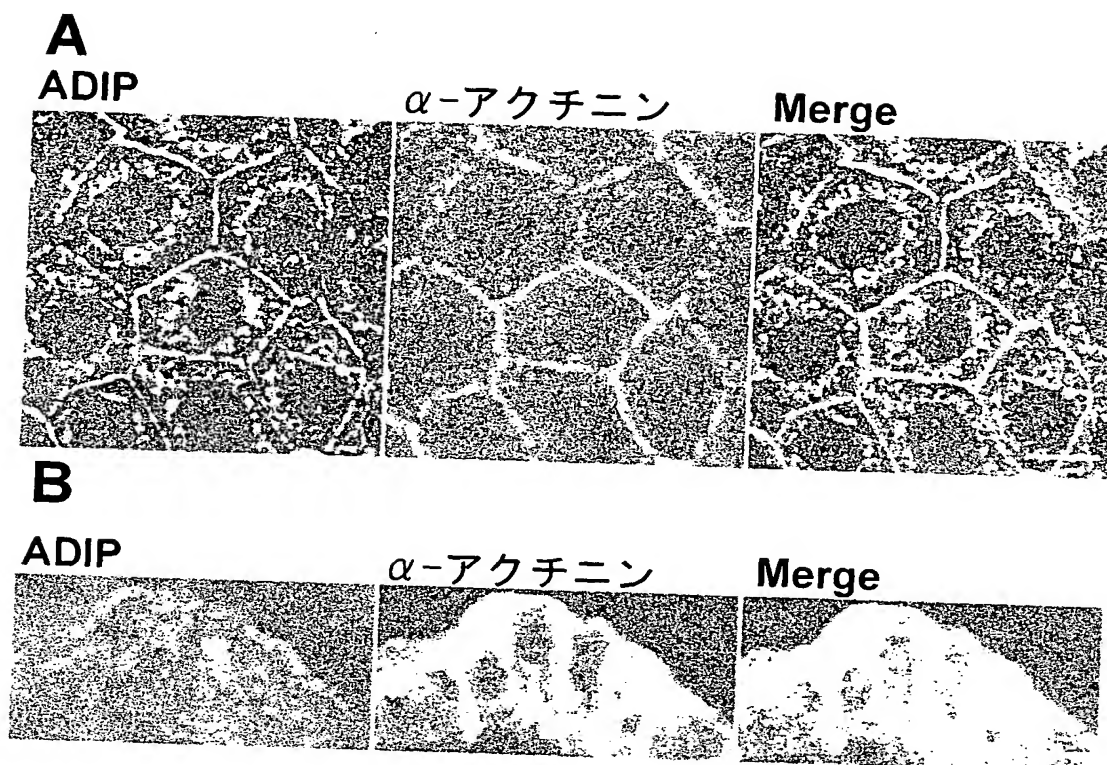
【図 8】



【図 9】



【図 10】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規なアフアディン DILドメイン結合性タンパク質(ADIP)遺伝子の提供、並びに、新規なADIPタンパク質の用途を提供することを課題とする。

【解決手段】 ネクチンおよびアフアディン系がどのように細胞間結合における密着結合および接着結合を組織化するかの洞察を得るために、酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行い、新規アフアディン結合タンパク質(ADIP)の同定に成功した。該新規タンパク質は、アクチン骨格を制御する薬剤を評価する際に有用である。

【選択図】 なし

特願 2002-284263

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000000217]

1. 変更年月日

1990年 8月29日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都文京区小石川4丁目6番10号

氏 名

エーザイ株式会社